



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de un método fluorométrico para medir el
transporte de calcio intraorganelar en protoplastos de
Arabidopsis thaliana.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ISRAEL GONZALEZ VIZUETH



México CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado

Presidente: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

Vocal: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

Secretario: DR. MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

1er suplente: DR. JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

2do suplente: DR. VICTOR HUGO AVILES ROSAS

Tutor: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Lab 115 Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

Israel Gonzalez Vizuet

(Sustentante)

Manuel Gutiérrez Aguilar

(Asesor)

Definiciones de abreviaturas del presente texto

MCU: Complejo uniportador de calcio mitocondrial

CRC: Capacidad de Retención de Calcio

Pi: Fosfato

MES: Ácido morfolino etanosulfónico

Medio MS: Medio Murashige-Skoog para germinación de semillas.

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

M: molar, unidad de concentración (mol/L)

RuR: Rojo de Rutenio Ru360: complejo de amonio de rutenio dinuclear

FRET: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

S: segundos

Agradecimientos

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IA203419 “Regulación genética de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”

Se agradece el apoyo de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y Dr. Felipe Cruz García por proporcionar materiales vegetales y reactivos necesarios para la culminación de el presente estudio.

Índice

Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 La importancia del calcio en plantas	9
1.2 Deficiencia y exceso de calcio en plantas.....	10
1.3 El transporte de calcio a través del xilema	12
1.4 El calcio y sus funciones en la célula.....	14
1.5 Sensores de calcio: Calmodulina y cinasas dependientes de Ca^{2+}	15
1.6 Transportadores de calcio en plasmalema e intracelulares	17
1.7 La Mitocondria: estructura y actividad de transporte de calcio	19
1.8 Rojo de rutenio: Características y actividad biológica	21
1.9 Los cloroplastos: Estructura y actividad de transporte de calcio	22
1.10 <i>Arabidopsis thaliana</i> como un modelo de estudio.....	23
2. Hipótesis	25
3. Objetivo general	25
3.1 Objetivos particulares	25
4. Metodología y Procedimiento Experimental.....	26
4.1 Material vegetal	26
4.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos.....	27
4.2.1 Solución enzimática	27
4.2.2 Solución W5.....	27
4.2.3 Amortiguador de lavado de Protoplastos.....	27
4.2.4 Amortiguador de reacción CRC.	28
4.3 Método «Tape Sandwich» [Wu, 2009].	29
4.4 Método tradicional [Yoo y cols; 2007]......	30
4.5 Permeabilización de protoplastos	33
4.6 Medición del transporte de calcio intracelular por fluorimetría de calcio.	36
5. Resultados:	38
5.1 Aislamiento de Protoplastos	38
5.2 Permeabilización de Protoplastos	40
5.3 Medición del transporte de Ca^{2+} en protoplastos permeabilizados.....	41
6. Discusión	44

7. Conclusiones	49
Bibliografía	50
Anexo:	60

Índice de Figuras y Tablas

Figura	Contenido	Página
A	Desordenes de calcio en cultivos de horticultura	11
B	Esquema del transporte de solutos por la vía apoplástica y simplástica	13
C	Modelo del segundo mensajero del acoplamiento estímulo-respuesta	16
D	Esquema de transportadores de calcio intracelulares tanto para influjo como eflujo	18
1	Estadios del desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2	Comparación de las metodologías utilizadas para la obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3	Estructura de la digitonina	33
4	Procedimiento de permeabilización con digitonina y tinción con azul de evans de protoplastos de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
5	Sistema de medición de fluorescencia acoplado a un ordenador	36
6	Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N.	37
7	Procedimiento para la medición del flujo de calcio por técnica fluorométrica	38
8	Preparaciones representativas de protoplastos obtenidos por las dos metodologías de aislamiento descritas	39
9	Observaciones microscópicas a diferentes aumentos en protoplastos permeabilizados de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
10	Experimento de medición de transporte de calcio y efecto del EDTA	41

11	Medición de transporte de Ca^{2+} intracelular utilizando 2×10^5 protoplastos	42
12	Medición de transporte de Ca^{2+} con inhibidor (RuR) y sin inhibidor, prueba estadística	43
13	Evaluación de los niveles del RNA del mensajero de MCU en <i>A. thaliana</i> . Imagen obtenida de Arabidopsis eFP Browser	48
Tabla 1	Contenido de calcio en porcentaje de peso seco de diferentes plantas	61
Tabla 2	Concentraciones de calcio en los compartimentos subcelulares	61

Resumen

El calcio es un ion de importancia en múltiples procesos celulares, tanto en plantas como animales. En condiciones fisiológicas, este contribuye a procesos de señalización y activación de vías metabólicas. En plantas, el exceso o ausencia de calcio intracelular puede ocasionar cambios en su fisiología. En el presente trabajo se desarrolló un método *in situ* para medir el transporte de calcio intraorganelar en protoplastos aislados de mesófilo de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados indican que los protoplastos de *A. thaliana* presentan una actividad de transporte de calcio no dependiente del uniportador de calcio mitocondrial. Para comprobar lo anterior, se estudió la sensibilidad del proceso de transporte de calcio a rojo de rutenio, el cual es un inhibidor específico del MCU. Los resultados sugieren que la actividad de transporte de calcio intraorganelar detectada podría ser debida a un sistema de transporte de calcio en cloroplastos o algún otro compartimento dentro de la célula.

1. Introducción

1.1 La importancia del calcio en plantas

El calcio es un elemento que constituye cerca del 2% de los minerales de la corteza terrestre. Este puede estar presente en cerca del 5% en suelos de tipo salino o áridos. Sin embargo, su presencia puede disminuir hasta 0.01% en suelos de zonas tropicales húmedas [Thompson y Troeh, 2002]. Su importancia para el crecimiento y desarrollo de las plantas es bien conocida. Por ejemplo, Wadleigh propuso en 1957 que las raíces de varias plantas son incapaces de desarrollarse en capas de suelo con bajos niveles de calcio incluso cuando otros minerales se encuentran en proporciones favorables [Wadleigh, 1957].

En la actualidad existen estudios en donde también se demuestra que el calcio es requerido para el crecimiento de diversas estructuras vegetales. Entre estas estructuras figuran los cigotos de algas, raíces y rizoides [Weisenseel y Kicherer, 1981]. Asimismo, se ha demostrado que en algunas plantas que producen flores (angiospermas) el calcio es fundamental para el crecimiento de los tubos polínicos. Lo anterior se demostró en experimentos en tubos polínicos en solución a los cuales se adicionó el ionóforo de calcio A23187, el cual cataliza el antiporte de calcio por dos protones [Reiss y Herth, 1979]. En estas condiciones, los tubos polínicos de *Lilium longiflorum* presentaron engrosamiento de la pared celular, arresto en el transporte de vesículas intracelulares, alteraciones en la función mitocondrial y su crecimiento fue completamente bloqueado. En otros estudios también se demostró que el transporte de calcio en tubos polínicos es modulado por un sistema de

señalización Rop1At dependiente de GTPasas en *Arabidopsis thaliana*. Cuando el sistema se encuentra activo, los tubos polínicos crecen en forma apical y se forma un gradiente en la concentración de calcio en la membrana apical [Li y cols., 1999].

En raíces, el citoesqueleto de actina juega un papel importante en el crecimiento celular en un proceso dependiente de calcio. Los agentes que desestabilizan al citoplasma como latrunculina y jasplakinólido disminuyen el potencial de membrana y ocasionan una redistribución en la concentración de calcio en el estado estacionario. Esto afecta el crecimiento de raíces [Wang y cols., 2010].

1.2 Deficiencia y exceso de calcio en plantas

El calcio en células está regulado en varios niveles, el primero de ellos se encuentra a nivel de la membrana celular, en donde se encuentran canales que permiten la entrada de calcio y otros que bombean calcio u otros solutos hacia el espacio extracelular para tener una concentración regulada de calcio libre en el citosol. En plantas, la concentración de Ca^{2+} libre es de $0.2\mu\text{M}$ [Buchanan,2000], dicha concentración es esencial en todas las células para prevenir la precipitación de fosfatos y mantener un estado de homeostasis.

La deficiencia de calcio es rara en la naturaleza, pero puede ocurrir en suelos con baja saturación de bases y / o altos niveles de deposición ácida [McLaughlin y Wimmer, 1999]. En la horticultura este fenómeno es común y llega a ocurrir produciendo varios trastornos por deficiencia de calcio (ver Fig. A y Shear, 1975). Estos generalmente surgen cuando el calcio no está disponible en cantidades adecuadas para los tejidos en desarrollo.

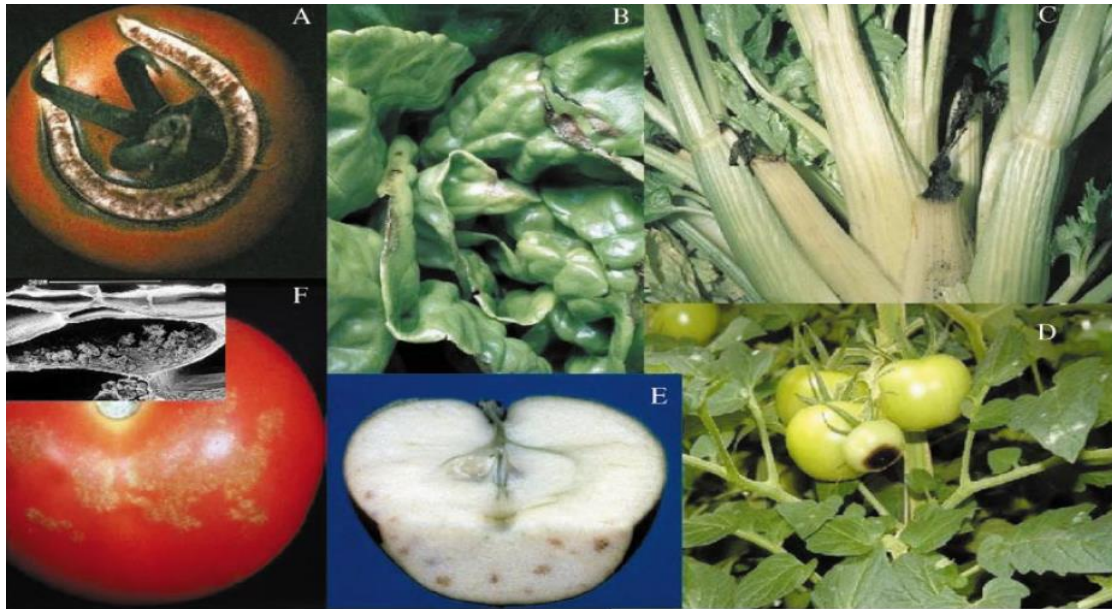


Figura A. Desordenes de calcio en cultivos de horticultura: (A) agrietamiento en fruto de tomate; (B) quemadura en lechuga; (C) deficiencia de calcio en el apio; (D) pudrición de la flor en frutos de tomates inmaduros; (E) hueso amargo en manzanas; (F) mancha de oro en frutos de tomate. Imagen tomada de White y Broadley, 2003.

Cuando los síntomas por deficiencia de calcio se desarrollan en las plantas, hay una etapa en la que los tejidos se llenan de agua y otro que involucra la degradación celular con pérdida de turgencia (como en la descomposición interna de las manzanas). Uno de los mecanismos que se propone por el que ocurre lo anterior, es que la deficiencia de calcio hace que las membranas sean permeables. Esto explicaría la pérdida de turgencia y permitiría que los fluidos celulares invadieran los espacios intercelulares. Una situación alternativa puede desarrollarse en frutos suaves y suculentos, cuyas células se rompen bajo condiciones hipotónicas *in vitro* [Simon, 1978].

Por otro lado, si la concentración de calcio citosólico se eleva, esto resultaría en citotoxicidad y en el continuo movimiento de este catión a través de canales permeables de membrana y compartimentos subcelulares a favor de su gradiente de concentración. Cuando hay exceso de Ca^{2+} en la solución de la rizosfera, las plantas pueden sufrir toxicidad por calcio. Esto puede prevenir la germinación de semillas y reducir las tasas de crecimiento de las plantas; en el tomate cultivado, por ejemplo, un síntoma de exceso de calcio es el desarrollo de pequeñas manchas amarillentas o "mancha dorada" en las paredes celulares alrededor del cáliz y los hombros de la fruta (ver *Figura A*).

1.3 El transporte de calcio a través del xilema

Como se mencionó anteriormente, las plantas obtienen calcio del suelo a través de las raíces más jóvenes cuando éste se encuentra en solución y es enviado al resto de la planta a través del xilema. El calcio puede atravesar la raíz a través del citoplasma de las células unidas por el plasmodesma (simplasto) o a través de los espacios conformados por pared celular entre las células. A esta estructura se le llama el apoplasto [White y Broadley, 2003]. Una vez que el calcio fue absorbido del suelo, este ingresa a la célula vegetal por transportadores permeables a Ca^{2+} de las membranas plasmáticas.

Posteriormente, este catión divalente debe ser transportado al cuerpo de la planta para distribuirlo en todas las células. Existen 2 vías típicas para transportar agua y solutos de célula a célula que ocurren de forma paralela, conocidas como vía simplástica y apoplástica. La primera se encuentra en la membrana plasmática, pues las células se encuentran unidas por túbulos conectados que conforman el plasmodesmo y la segunda se encuentra fuera de la membrana plasmática. Esta consiste casi íntegramente en el transporte a través de las paredes celulares y en las células conductoras del xilema [Buchanan,2000]. La Figura B ilustra que las dos rutas ocurren de forma paralela.

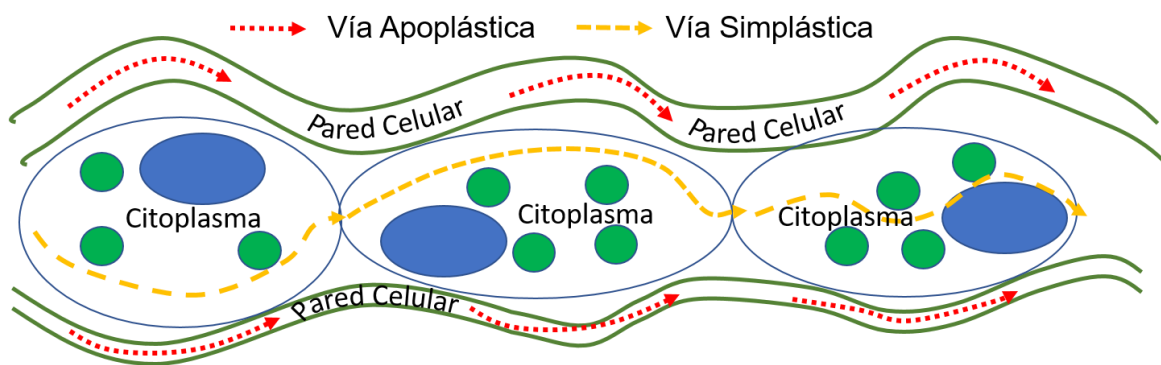


Figura B. Esquema del transporte de solutos por la vía apoplástica y simplástica.

Ambas vías tienen sus ventajas y desventajas. La vía apoplástica permite que el calcio se transporte al xilema sin un impacto en la concentración de Ca^{2+} citosólico [White, 1998]. La señalización intracelular requiere que se mantenga a niveles submicromolares de la célula en reposo. Como desventaja de esta vía se sabe que es relativamente no selectiva entre diversos cationes divalentes [White, 2001]. Esto a su vez podría provocar la acumulación de solutos tóxicos. La vía simplástica

permite a la planta controlar la velocidad de transporte y selectividad del ion calcio al cuerpo de la planta [White, 2001]. Al ser una vía más regulada, el calcio podría distribuirse selectivamente al xilema a una velocidad consistente con los requisitos del brote de la planta.

1.4 El calcio y sus funciones en la célula

El calcio es un ion cuya concentración debe ser finamente modulada dentro de las células. Tanto en vertebrados como en plantas, este ion tiene múltiples funciones a nivel extra e intracelular. Por ejemplo -en vertebrados- el calcio se encuentra asociado a procesos de contracción muscular, división celular, secreción, fecundación, metabolismo, transcripción y muerte celular [Somlyo, 1984; Karp, 2011]. En plantas, el calcio contribuye al crecimiento de células polarizadas en raíces y tubos polínicos [Nakagawa y cols., 2007; Hepler y cols., 2011]. La forma como el calcio modula estos procesos en muchos casos se desconoce -sin embargo- en otros procesos se conocen los transportadores, bombas y receptores proteínicos que interactúan con el calcio para desencadenar una respuesta a estímulos tanto en respuesta a mensajes extracelulares, como a nivel citoplásmico [Seidel y cols., 2015; Allen y cols. 1995; Urbina y cols., 2006].

Para que ocurran los cambios de concentración de los iones calcio, estos tienen que entrar o salir de la célula o de los compartimentos en los que se encuentran. Para esto la célula cuenta con distintas bombas o intercambiadores iónicos modulados por voltaje u otro tipo de señal. En condiciones fisiológicas, el retículo endoplasmático constituye el sitio de mayor almacenamiento de calcio en plantas

[Galva y cols., 2013; Johnson y cols., 2009; Geisler y cols., 2000]. Para internalizar calcio en contra de su gradiente de concentración, el retículo endoplasmático hace uso de ATPasas de calcio, mientras que la liberación de este catión está mediada por transportadores sensibles a inositol 1,4,5-fosfato y a rianodina [Wang y cols., 2012; Sanders y cols., 1994]. Bajo diversos estímulos celulares, el retículo endoplásmico libera en cierta proporción el calcio acumulado y éste origina cambios en la actividad metabólica y transcripcional de la célula [Galva y cols., 2013; Johnson y cols., 2009; Geisler y cols., 2000]. A nivel mitocondrial y en cloroplastos, el calcio también resulta importante para activar deshidrogenasas y cadenas de transporte de electrones. Al igual que para el retículo endoplásmico, tanto las mitocondrias como los cloroplastos utilizan canales que introducen y liberan calcio en función de los requerimientos de la célula (ver sección de calcio mitocondrial y cloroplástico).

1.5 Sensores de calcio: Calmodulina y cinasas dependientes de Ca^{2+}

La célula está en constante movimiento y comunicación tanto con su medio externo como el interno, para lo cual utiliza distintas vías para sensor y transducir las señales que se encuentran en el medio. El calcio al ser uno de los principales segundos mensajeros e intermediarios de la señalización celular cuenta con mecanismos y sensores para la transducción de estas señales.

La calmodulina es generalmente reconocida como el mediador universal de calcio que actúa como segundo mensajero [Klee y cols., 1986]. Se trata de una proteína pequeña de 15 a 17 kDa con 150 aminoácidos aproximadamente y está altamente conservada. Las secuencias de calmodulina en plantas y animales difieren de 12 a 13 aminoácidos y cuenta con 4 sitios de unión a calcio [Buchanan,2000]. A pesar de que es una proteína que carece de actividad enzimática propia, esta regula y activa más de 20 enzimas [Means, 1991]. Se trata de una característica única y propia de esta proteína. Tiene un papel similar al cAMP y como se ilustra en la figura A, estas dos proteínas se encuentran como proteínas aceptoras que reconocen cambios en la concentración de segundos mensajeros inducidos por estímulos externos y transmite esta información a proteínas intracelulares bajo el control de estas señales.

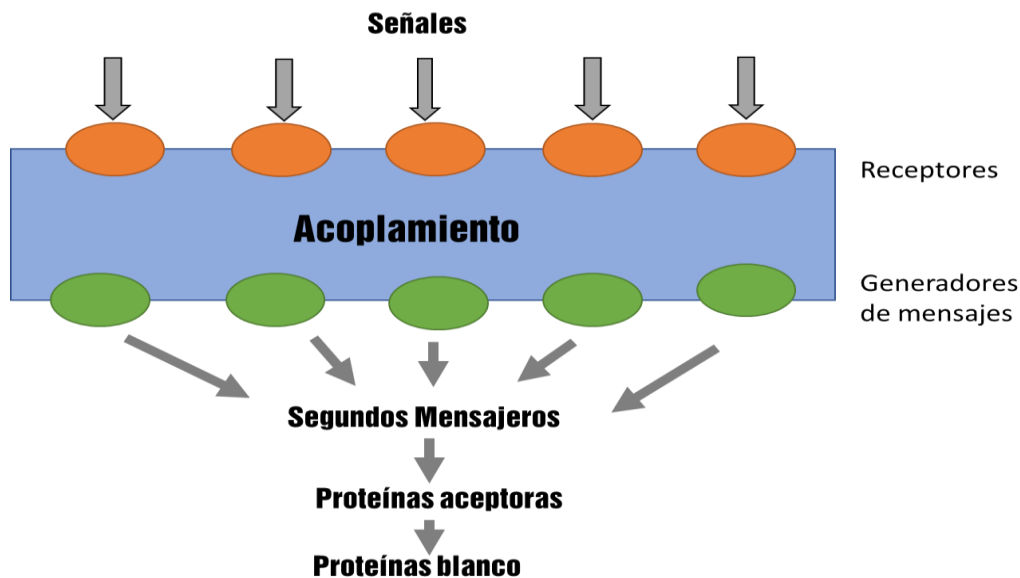


Figura C. Modelo segundo mensajero del acoplamiento estímulo-respuesta.

El acoplamiento estímulo-respuesta mediado por calmodulina incluye varios pasos: (1) un transitorio incremento en la concentración de Ca^{2+} de 10^{-7} a 10^{-5} M, (2) interacción del calcio con calmodulina y (3) activación e interacción coordinada con proteínas y enzimas reguladas por calmodulina.

Existe toda una familia de proteínas que también participan en el proceso de señalización. Entre estas destacan las cinasas C y la información de señales extracelulares, las cuales incluyen un grupo de hormonas y algunos neurotransmisores. La transducción de señales mediada por calcio viaja desde la superficie celular hacia el interior de la célula a través de dos vías (1) la activación de la proteína cinasa C y (2) la movilización de Ca^{2+} . Bajo condiciones fisiológicas, la proteína cinasa C es activada por el diacilglicerol en presencia de fosfolípidos de membrana [Kitano, 1986]. En plantas se producen de igual manera numerosas actividades por quinasas dependientes de calcio. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 34 probables cinasas dependientes de calcio [Cheng S. H, 2002]. Aun así, conocer los roles fisiológicos en los que participan las cinasas dependientes de calcio sigue siendo un tema de investigación.

1.6 Transportadores de calcio en plasmalema e intracelulares

Muchas funciones en la célula dependen de cambios transitorios en la concentración de calcio citosólico libre. Existen dos mecanismos básicos por los cuales puede haber un incremento en la concentración de calcio: (1) por la liberación

de iones calcio de las reservas de calcio intracelular, y (2) por el movimiento de iones calcio bajo su gradiente electroquímico, del espacio extracelular al interior de la célula a través de la membrana plasmática.

De acuerdo a la figura D, existe una gran cantidad canales de calcio en la célula.

Algunos de ellos son bombas, intercambiadores o canales específicos a este catión.

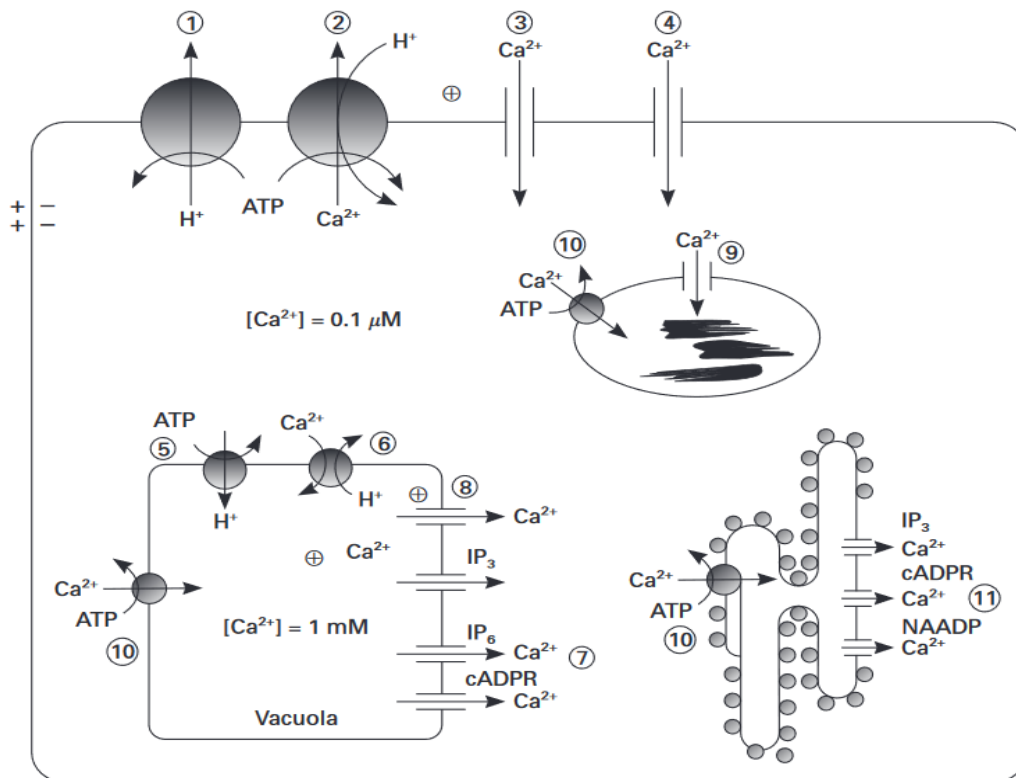


Figura D. Tráfico de Ca^{2+} en una célula vegetal. 1) H^+ -ATPasa. 2) Ca^{2+} - H^+ ATPasa del plasmalema. 3) y 4) Distintos tipos de canales de Ca^{2+} del plasmalema. 5) H^+ -ATPasa de la vacuola. 6) Antiporte Ca^{2+} - H^+ del tonoplasto. 7) y 8) Canales de Ca^{2+} del tonoplasto; el signo «+», IP_3 , IP_6 y cADPR indica que los canales se activan por voltaje, inositol trifosfato, inositol hexafosfato y la ADP ribosa cíclica, respectivamente. 9) Canal de Ca^{2+} en el cloroplasto. 10) Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático, vacuola y cloroplasto. 11) Canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático; IP_3 , cADPR y NAADP significan que los canales se activan por inositol trifosfato, ADP ribosa cíclico y ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato, respectivamente. Imagen tomada de [Azcón, 2000].

La función de los canales e intercambiadores es mantener reguladas las concentraciones de calcio a nivel intracelular y en el citosol; como se describe en la **Tabla 2** (ver anexo), los distintos compartimentos subcelulares son reservorios de calcio y muchos de ellos tienen oscilaciones en los niveles de calcio específicas que generan una señal que puede ser interpretada por la célula.

1.7 La Mitochondria: estructura y actividad de transporte de calcio

Las mitocondrias son organelos alargados, ovales o cilíndricos. Su tamaño oscila entre 1 y 4 μm [Karp, 2011]. Utilizando técnicas de microscopia de fluorescencia se ha detectado que su forma y posición intracelular no son estáticas y que estos organelos poseen la capacidad de modificar su estructura y localización por procesos de fusión, fisión e interacciones con el citoesqueleto [Frey y Mannella, 2000]. Mediante técnicas de microscopía se puede observar que las mitocondrias forman filamentos alargados y que éstas comienzan a dividirse en fragmentos más pequeños [Lee y Yoon, 2014]. La mitocondria también cuenta con su propio material genético. En el ser humano se sabe que el mtDNA codifica para 13 proteínas mitocondriales y para 22 RNA de transferencia.

Otra característica de las mitocondrias es que presentan dos membranas: externa e interna. La membrana mitocondrial interna se puede dividir en 2 dominios: membrana interna limitante (en la periferia con la membrana externa) y las denominadas crestas mitocondriales, que se encuentran al interior del organelo y son claramente visibles mediante microscopia electrónica [Frey y Mannella, 2000].

La membrana externa es la envoltura principal de la mitocondria y marca los límites con el exterior. El espacio entre ambas membranas es también muy importante ya que se encuentran proteínas que participan en el inicio de la muerte celular por la vía intrínseca [Keinan y cols., 2013].

Las mitocondrias presentan una permeabilidad selectiva a la gran mayoría de los solutos y metabolitos presentes en el citoplasma. Para preservar esta propiedad, las mitocondrias expresan porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje en la membrana externa -los cuales facilitan el transporte de especies con carga o neutras siempre y cuando estas no excedan los 5 kDa [Colombini, 2007]. Una vez en el espacio intermembranal, los solutos pueden ser transportados por acarreadores específicos a través de la membrana interna mitocondrial [Gutierrez-Aguilar y Baines 2013]. Estos acarreadores permiten el transporte de moléculas diversas como ATP, piruvato, aminoácidos y dicarboxilatos entre otros. De hecho, es gracias a esta propiedad de compartimentalización metabólica que los procesos de glucólisis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa y el ciclo de la urea se encuentran finamente separados y regulados en la célula [McCommis y Finck, 2015; Gutierrez-Aguilar y Baines 2013].

Las mitocondrias también actúan como conductores intracelulares de la regulación de Ca^{2+} , conforman, remodelan, transmiten y descodifican las señales de Ca^{2+} , debido a su capacidad para acumular Ca^{2+} de forma rápida y transitoria en su interior. En 2011 dos diferentes grupos de investigación identificaron a la proteína conocida como MCU, responsable del transporte de calcio mitocondrial [Baughman

y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011]. La proteína MCU forma tetrámeros o pentámeros en la membrana interna mitocondrial en función de la especie. Por ejemplo, en hongos y en pez zebra (*Danio rerio*) se ha observado que MCU forma dímeros de dímeros (tetrámeros) [Baradaran y cols., 2018; Nguyen y cols., 2018; Yoo y cols., 2018]. En *Caenorhabditis elegans* y en otras especies se ha determinado mediante resonancia magnética que MCU es un pentámero [Oxenoid y cols., 2016]. Estos estudios -aunados a estudios anteriores- han permitido identificar a proteínas homólogas de MCU en casi todo el dominio eucarionte [Bick y cols., 2012]. En plantas se han detectado ortólogos de MCU en *Pyrus seratina* (pera) [Baradaran y cols., 2018], *A. thaliana* [Teardo y cols., 2017; Selles y cols., 2018] y recientemente nuestro laboratorio ha identificado y descrito la presencia de un probable uniportador de calcio mitocondrial sensible a rojo de rutenio en tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* [Flores-Herrera y cols., 2018] (**ver anexo**). La regulación de los niveles de calcio a nivel mitocondrial es muy importante tanto para plantas como animales. En mamíferos, las elevaciones de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial estimulan la respiración y la síntesis de ATP para cubrir las necesidades energéticas de las células de forma temporal. La sobrecarga de Ca^{2+} - por el contrario- puede desencadenar la muerte célula y la presencia de inhibidores del transporte de calcio mitocondrial ocasiona la estabilización de los gradientes de calcio y la reanudación del crecimiento en raíces [Wang y cols., 2010].

1.8 Rojo de rutenio: Características y actividad biológica

El rojo de rutenio (RuR) es un colorante inorgánico que se usa recurrentemente en microscopia para algunas tinciones. Por ejemplo, se ha utilizado para la caracterización morfológica de la pared vegetal primaria de la planta de algodón [Ansell, 2009]. En muchos laboratorios, el RuR es utilizado para inhibir los cambios en las concentraciones de calcio dentro de la célula. Otra de las propiedades de este compuesto es la de inhibir el MCU a concentraciones muy bajas (nM) y por lo tanto no permitir la entrada de calcio a la mitocondria. Esta propiedad fue descrita después de 1960, cuando se descubre la captación de calcio en mitocondrias aisladas de homogenados de riñón de rata y con calcio radiomarcado [Deluca, 1961]. En experimentos posteriores se utilizaron compuestos derivados del RuR (Ru360) y lantano como inhibidores potentes de flujo de calcio a través de poros selectivos de calcio. La alta especificidad de los compuestos de rutenio al complejo MCU quedó demostrada en un estudio [Baughman y cols., 2011], donde se estudiaron los efectos del RuR en células con la mutación S259A del complejo MCU. En estos experimentos se demostró que el Ru360 carece de efecto en la cepa con la mutación. Por otro lado, experimentos del grupo de Hajnóczky han demostrado que la unión del RuR a MCU depende de subunidades regulatorias como MICU1 y que la sensibilidad del transporte de calcio a inhibidores derivados del rutenio puede ser modulada en función de los niveles de expresión de estos componentes accesorios [Paillard y cols., 2018].

1.9 Los cloroplastos: Estructura y actividad de transporte de calcio

Las primeras formas de vida en la tierra primitiva debieron obtener sus nutrientes a partir de moléculas orgánicas simples, las cuales eran abundantes [Cooper y Hausman, 2014]. Los organismos fotoautótrofos se caracterizaron por usar la energía proveniente de las radiaciones solares para establecer la fotosíntesis de moléculas con poder reductor como el NADPH. Para ello, estos organismos utilizaron H₂O como donador de electrones en un proceso llamado fotólisis en donde se genera O₂ y electrones libres los cuales son usados por cadenas de transporte. Estos organelos pueden medir de 4 a 20 μm³ en volumen y «se encuentran delimitados por una cubierta de dos membranas yuxtapuestas» [Nicholls y Ferguson, 2013]. En el espacio correspondiente a la matriz se encuentran los tilacoides formados por membranas tilacoidales y un lumen de naturaleza ácida debido al bombeo de protones por bombas primarias dependientes de fotones. Por su naturaleza ácida, al lumen tilacoidal se le conoce como la fase «P» por ser la fase rica en H⁺, mientras que el estroma es considerado como la fase «N» al tener deficiencia de cargas positivas y ser de naturaleza relativamente «negativa» [Nicholls y Ferguson, 2013].

Al igual que la mitocondria, los cloroplastos presentan transportadores de calcio los cuales se han estudiado someramente [Loro y cols., 2016]. Sin embargo, en la actualidad no se conoce la identidad proteica de transportadores involucrados en la internalización de calcio.

1.10 *Arabidopsis thaliana* como un modelo de estudio

La planta *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae y se ha usado ampliamente en estudios de genética molecular y bioquímica por su rápido crecimiento y por ser de fácil manipulación genética [Koncz y cols.,1992]. En la actualidad existe una gran variedad de líneas mutantes carentes o con sobreexpresión de diversos genes, así como mutantes con sobreexpresión de proteínas de fusión y transgenes [para más información, visitar <https://abrc.osu.edu/resources>].

Los protoplastos de hojas del mesófilo de *A. thaliana* constituyen un modelo celular ampliamente utilizado en estudios de metabolismo vegetal. Estas células permiten llevar a cabo estudios de bioquímica, genética y biología celular en condiciones fácilmente controladas [Scott y Logan, 2008; Wu y cols., 2009]. Adicionalmente, es posible manipular estas células con plásmidos para estudiar el papel de determinados genes en la función celular [Sang y cols., 2011]. Para la obtención de protoplastos de *A. thaliana* existen varios métodos, sin embargo, la gran mayoría de éstos convergen en el punto de degradación de la pared celular con enzimas hidrolíticas que permiten digerir la celulosa y amilopectina en condiciones controladas [Yoo y cols., 2007; Wu y cols., 2009].

En el presente trabajo se llevaron a cabo dos procesos de aislamiento de protoplastos seguidos de un protocolo de permeabilización de la membrana utilizando bajas concentraciones del detergente no iónico digitonina. Esto con la finalidad de caracterizar el transporte de calcio intraorganelar en protoplastos de *A. thaliana*. Los resultados demuestran que existe un sistema de transporte de calcio subcelular diferente al uniportador de calcio mitocondrial [Teardo y cols., 2017;

Selles y cols., 2018]. Finalmente, en este trabajo se discute la probable identidad y relevancia del sistema de transporte de calcio intraorganelar para la homeostasis celular.

2. Hipótesis

Si el transporte de calcio en protoplastos permeabilizados de *Arabidopsis thaliana* no es sensible a rojo de rutenio, entonces el uniportador de calcio mitocondrial no contribuye sustancialmente a la acumulación de calcio intracelular.

3. Objetivo general

Desarrollar un método fluorométrico *in situ* para medir el flujo de calcio intraorganelar en protoplastos aislados de *Arabidopsis thaliana* y determinar el efecto del rojo de rutenio en tal proceso.

3.1 Objetivos particulares

- Aislar protoplastos mediante dos métodos descritos en la literatura para determinar el procedimiento óptimo.
- Permeabilizar la membrana plasmática utilizando digitonina.
- Probar el método fluorométrico con distintas cantidades de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* para determinar el rango de funcionamiento del método.

- Medir el efecto del rojo de rutenio como inhibidor de la entrada de calcio mitocondrial.

4. Metodología y Procedimiento Experimental

4.1 Material vegetal

El ecotipo de *A. thaliana* utilizada para los estudios presentados es la Col-0 y ésta fue proporcionada amablemente por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto de la Facultad de Química, UNAM. Las semillas se germinaron en macetas con sustrato compuesto (Sunshine Mix #3) adicionado con vermiculita y

perlita en la proporción 3:1:1 [Pedroza-García y cols., 2015] como en placas al 2% de agar con 2% de sacarosa y medio MS durante 3-4 semanas. Se recolectaron las hojas de *Arabidopsis thaliana* de 2 a 4 semanas de desarrollo, preferentemente se deben cortar aquellas en los estadios 5-7 (ver figura 1) a las que se les conoce como hojas verdaderas. Al utilizar hojas recolectadas posteriormente a las 3 semanas de desarrollo se obtienen una cantidad menor de protoplastos.

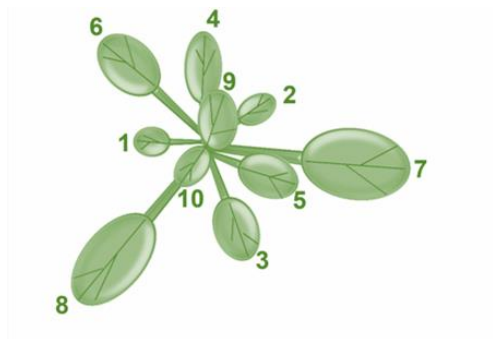


Figura 1. Diferentes estadios del desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (Imagen tomada de Merchant y cols., 2015).

4.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos

En el presente proyecto se utilizaron las soluciones enzimáticas y amortiguadoras de aislamiento de protoplastos descritas a continuación.

4.2.1 Solución enzimática (15 a 20 mL para cada 20-30 hojas)

Se prepara siempre fresca en un tubo Falcon de 50 mL

- Celulasa C0615-1G-SIGMA al 1.5% (0.15 g/10 mL)
- Macerozima P2401-1KU-SIGMA al 0.4% (0.04 g/10 mL)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M), precalentar a 55°C
- KCl 20 mM (stock 2 M)
- MES 20 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M), precalentar a 55°C.
- CaCl₂ 10 mM (Stock 1 M)

*Una vez lista la solución enzimática se usa un filtro estéril de jeringuilla (CORNING) de 0.45 µm para verter en la caja Petri y evitar el paso de partículas extrañas.

4.2.2 Solución W5

- NaCl 154 mM (stock 4M)
- CaCl₂ 125 mM (stock 1 M)
- KCl 5 mM (stock 2 M)
- MES 2 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M)

4.2.3 Amortiguador de lavado de Protoplastos.

- EDTA 0.1 mM (stock 100 mM)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M)
- Pi 1 mM (stock 1M)
- MES 10 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M),

Adicionalmente se usó la solución para medición de capacidad de retención de calcio de protoplastos conteniendo:

4.2.4 Amortiguador de reacción CRC.

- Amortiguador de lavado de protoplastos c.b.p. 1000 μ L
- Digitonina 20 μ g/mL (stock 20 mg/mL)
- Calcium Green 5-N 1 μ M (stock 1 mM),
- Succinato de Sodio 10 mM (stock 0.2 M)
- CaCl₂ 0.1 M
- Rojo de Rutenio (RuR) 100 nM (stock 1 μ M)

Para el proceso mecánico del aislamiento, previo al uso de la solución enzimática se usan los siguientes materiales:

- Hojas verdaderas de *A. thaliana* ecotipo col-0 (2-3 semanas de crecimiento).
- Magic tape (3 M, St, EUA).
- Cinta adhesiva (Tuck, México)
- Filtro de jeringuilla estéril de 0.45 μ m
- Caja Petri.
- Pinzas de disección.
- Tijeras.
- Cuchillas de afeitar.

Los protoplastos se aislaron por dos métodos distintos y en ambos casos se determinó la eficiencia del aislamiento:

4.3 Método «Tape Sandwich» [Wu, 2009].

Se utilizan de 15-20 hojas verdaderas de *A. thaliana*. En este método, el haz o epidermis superior de la hoja se cubre con «cinta adhesiva» y el envés o epidermis inferior con «cinta mágica». Posteriormente se remueve la cinta mágica con el fin de remover el epitelio más externo y dejar al descubierto las células del mesófilo. Se puede comprobar que se realizó de manera correcta si en la cinta removida queda una pequeña película de la hoja color verde. Una vez removida la cinta mágica de todas las hojas, se vierte la solución enzimática en la caja Petri y se embeben las hojas de *A. thaliana* con la cara inferior de la hoja hacia abajo y se dejan agitando de 20 a 60 min temperatura ambiente a 40 rpm. Las hojas se retiran cuando la solución se torna verde, lo cual indica que hubo liberación de protoplastos al medio. Terminado el tiempo de agitación se diluye la suspensión con el mismo volumen de solución W5 y se filtra a través de Miracloth. El filtrado se recupera y se centrifuga a 200 x g (4°C) por 2 min. Se remueve el sobrenadante y el botón se resuspende agitando suavemente en forma de remolino. Se verifica la cantidad y calidad de los protoplastos depositando dos alícuotas de 20µL en cada puerto en un hematocitómetro convencional para contar el número de protoplastos y evaluar su calidad al microscopio.

Este método permite la obtención de protoplastos sin necesidad de aplicar tratamientos de vacío y disminuye el tiempo de incubación necesario con las enzimas: celulasa y macerozima. Además, utiliza un número menor de hojas y no se requiere gran habilidad técnica para llevar a cabo el procedimiento.

4.4 Método tradicional [Yoo y cols; 2007].

Este método es ampliamente utilizado por investigadores del ramo y a pesar de requerir condiciones de vacío y un mayor tiempo de incubación, se ha encontrado que los protoplastos obtenidos por este método son susceptibles de ser transformados con plásmidos y sometidos a manipulaciones sin afectar la viabilidad de estos. Se depositan de 20-30 hojas verdaderas de *A. thaliana* sobre una hoja blanca (papel bond) y se cortan con ayuda de una navaja de afeitar o bisturí en finas tiras (0.5 mm y 1 mm, óptimo). Conforme se cortan en tiras, estas se transfieren a la solución enzimática asegurándose de sumergirlas por ambos lados con ayuda de las pinzas. Se remueve la tapa de la caja Petri, se coloca en un desecador y se aplica vacío leve por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se vuelve a colocar la tapa a la caja Petri, se cubre con aluminio y se continúa con la digestión enzimática en un agitador por 90 minutos a 40 rpm. La solución se torna verde, lo cual indica la liberación de los protoplastos.

Una vez concluidos los 90 min, se diluye la solución agregando un volumen de la solución W5 y se filtra con Miracloth. El filtrado se recupera y se centrifuga a 200 x g (4°C) por 2 min a temperatura ambiente. Se remueve el sobrenadante y el botón se resuspende agitando suavemente en forma de remolino. Se determina la cantidad y calidad de los protoplastos utilizando un hematocitómetro y observando bajo el microscopio.

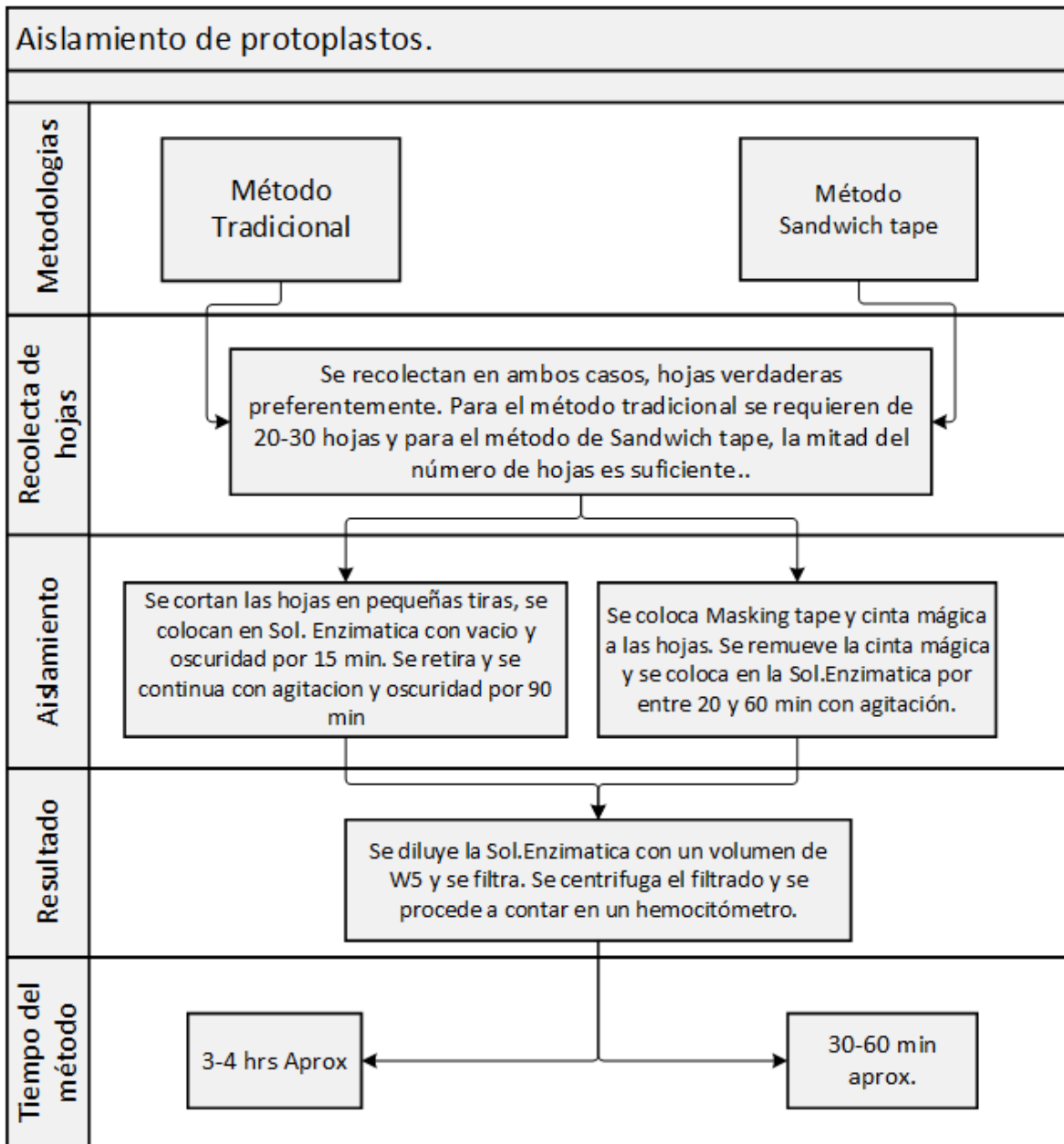


Figura 2. Comparación de las metodologías utilizadas para la obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

4.5 Permeabilización de protoplastos

Una ventaja de utilizar células permeabilizadas para llevar a cabo experimentos con organelos en condiciones *in situ* es que las estructuras subcelulares se preservan y las

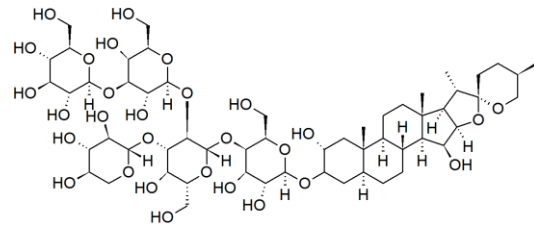


Figura 3. Estructura de la digitonina (CAS 11024-24-1).

interacciones entre estas permiten mediciones más apegadas a una situación fisiológica *versus* experimentos con organelos aislados. Actualmente existen diferentes métodos para permeabilizar células descritos en la literatura. Por ejemplo, se ha demostrado que los esferoplastos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden ser permeabilizados con bajas concentraciones del antimicótico nistatina [Manon y Guérin, 1998]. Estas condiciones han permitido caracterizar la actividad electroquímica y respiratoria de las mitocondrias de esta levadura.

Otro agente con efectos de permeabilización de las membranas plasmáticas (pero no intracelulares) son las moléculas de la familia de las saponinas esteroidales. Entre estas, una molécula ampliamente utilizada en experimentos de permeabilización es la digitonina (Fig. 2). Su estructura presenta alta afinidad por moléculas de colesterol presentes en la membrana plasmática. Al interactuar con moléculas de colesterol, la digitonina forma precipitados y al desprenderse de la membrana forma discontinuidades (poros) que permiten el transporte inespecífico de moléculas al interior de la célula [Sudji y cols., 2015]. A pesar de ser una técnica ampliamente utilizada en células de origen mamífero, su utilización en modelos de plantas no se ha descrito. Con la finalidad de evaluar el grado de permeabilidad de

los protoplastos, sometimos a las células a un ensayo de permeabilización usando una concentración de 0.01% de digitonina durante 5 min en condiciones estándar de presión y temperatura. Esta concentración de digitonina es diez veces mayor a la utilizada comúnmente en células de mamíferos [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2014] pero se ha usado en células del mixomiceto *Dictyostelium discoideum* [Kovács-Bogdan y cols., 2014]. Para validar el protocolo de permeabilización, sometimos varios lotes de protoplastos intactos o tratados con digitonina a una tinción con Azul de Evans al 0.1% y los protoplastos se lavaron dos veces con un amortiguador isotónico. La finalidad de hacer permeable las membranas de los protoplastos es asegurarnos que los pulsos de calcio que se adicionen entren a la célula y que, al momento de medir cambios en la concentración de calcio, éstos sean debidos a la entrada del catión a compartimentos subcelulares. Hasta ahora, el mecanismo por el cual la digitonina interactúa con la membrana ha sido descrita sólo de forma cualitativa [Fan y cols., 2017]. Sin embargo -para los fines del presente trabajo- la tinción con azul de Evans representa una estrategia sencilla y rápida para determinar el grado de permeabilización de la membrana plasmática.

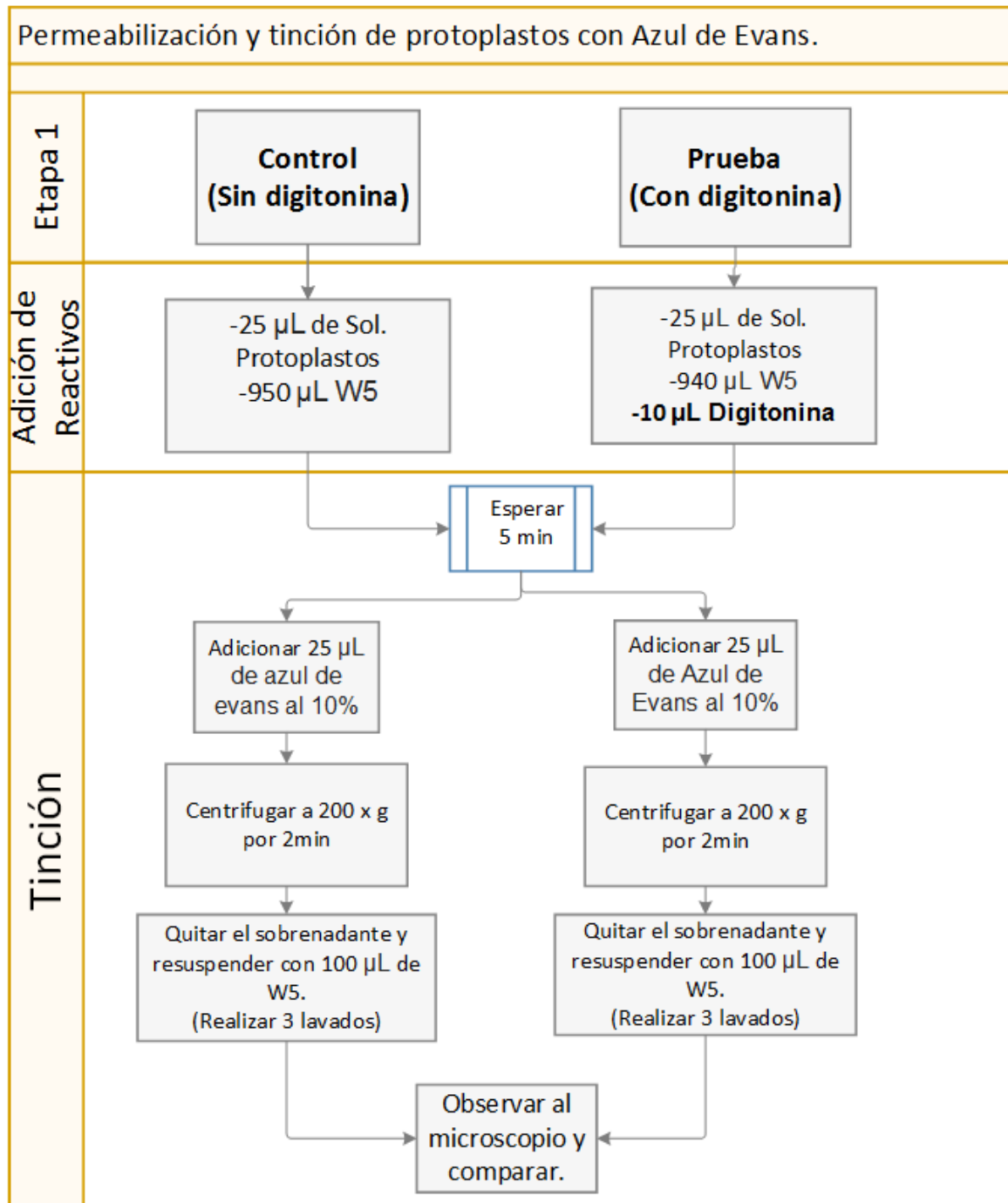


Figura 4. Procedimiento de permeabilización con digitonina y tinción con azul de Evans de protoplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Se utiliza un control al que no se le adiciona digitonina.

4.6 Medición del transporte de calcio intracelular por fluorimetría de calcio.

El transporte de calcio es un fenómeno que se ha documentado ampliamente usando técnicas electroquímicas y espectroscópicas tanto en mitocondrias aisladas de diversas fuentes como en células permeabilizadas (ver *Permeabilización de protoplastos*). En el presente

trabajo se utilizó un método cuantitativo de detección de los cambios en la concentración de calcio utilizando el indicador Calcium Green -5N [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2014]. Una molécula descrita inicialmente como una sonda sensible a Ca^{2+} y utilizada en experimentos para medir cambios en lo niveles de calcio en neuronas de ratas [Rajdev, 1993]. Este

fluoróforo tiene la capacidad de unirse al calcio con una $K_d = 14 \mu\text{M}$, cuenta con una longitud de onda máxima de excitación de 506 nm y una máxima de emisión de 532nm (Fig. 6), lo que lo hace idóneo para la medición del transporte electroforético de calcio a la mitocondria u otros organelos. Posteriormente, se adaptó un fluorómetro portátil (Spectrovis PlusVernier) con conectividad USB acoplado a un agitador magnético estándar a 60Hz. Esto permite mantener una suspensión de protoplastos

A



B

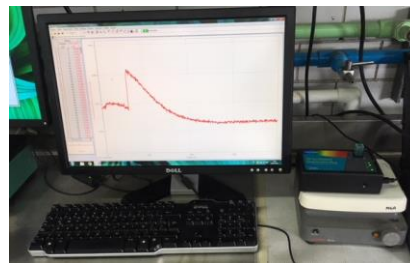


Figura 5. Sistema de medición de fluorescencia acoplado a un ordenador.

homogénea y una mezcla adecuada de los componentes de la reacción (Fig. 3).

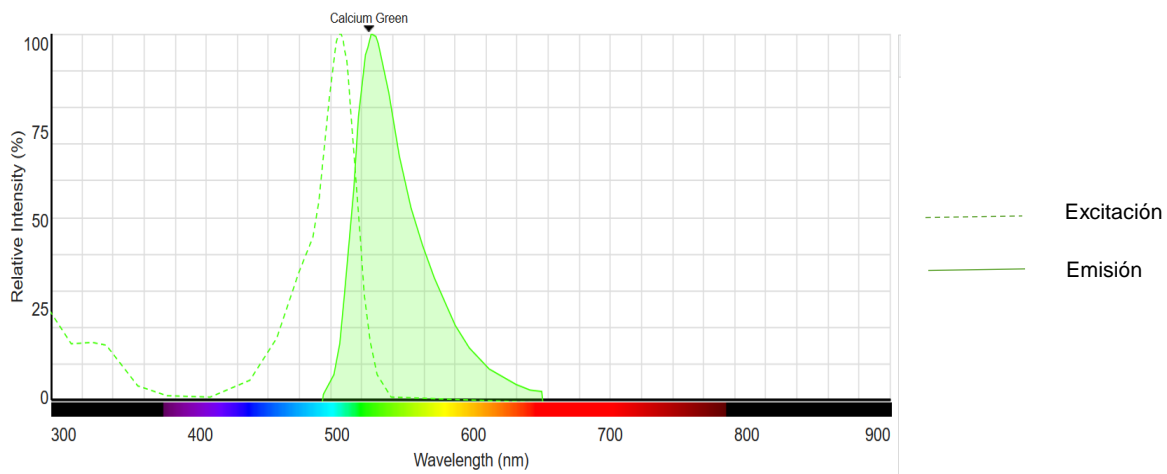


Figura 6. Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N. Imagen modificada de la hoja del reactivo obtenido de ThermoFisher Scientific.

En esencia, el método requiere células permeabilizadas a una densidad óptica tal que no interfieran con las mediciones. Experimentalmente se determinó que 2×10^5 células es un número adecuado que permite medir cambios en la concentración de calcio con mínima interferencia.

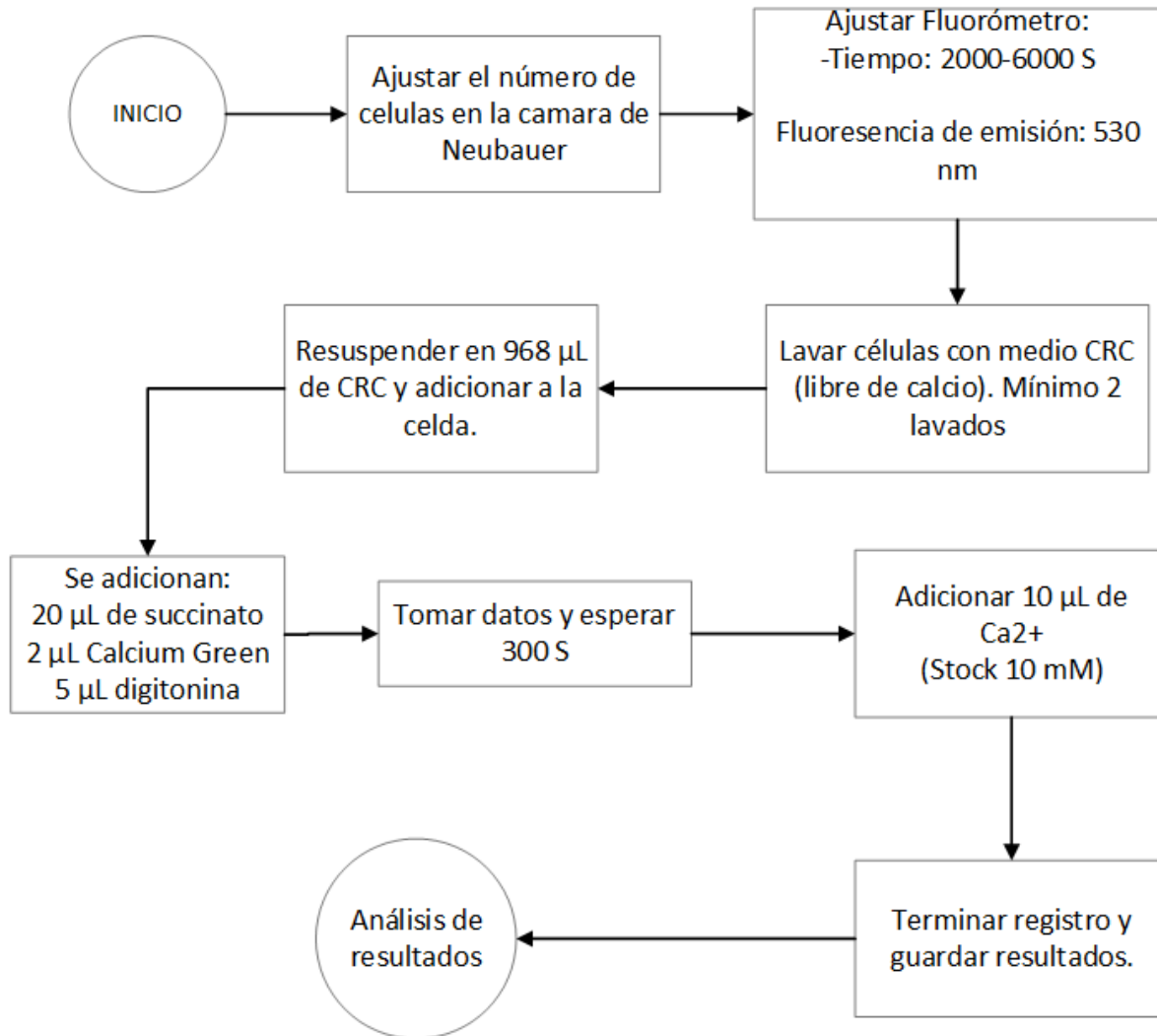


Figura 7. Procedimiento para la medición del flujo de calcio por técnica fluorométrica.

5. Resultados:

5.1 Aislamiento de Protoplastos

Se llevaron a cabo los dos procedimientos de aislamiento anteriormente descritos y se observaron los protoplastos obtenidos bajo el microscopio.

Se apreciaron células con las características morfológicas típicas de una buena preparación al utilizar el método tradicional (Fig. 7A). Esto es, los protoplastos presentaron morfología esférica delimitada por una fina membrana en contacto con cloroplastos.

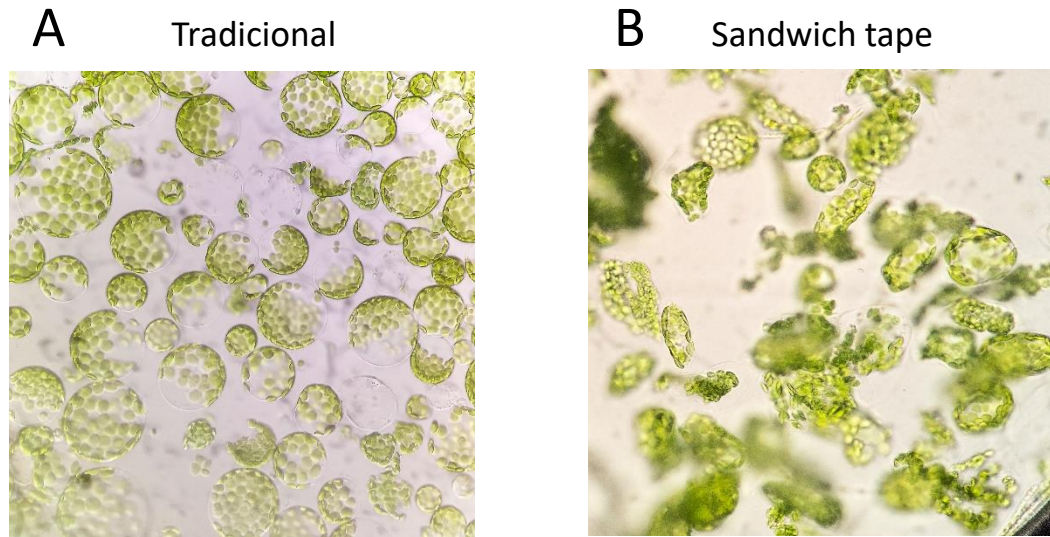


Figura 8. Preparaciones representativas de protoplastos obtenidos por las dos metodologías descritas. (A) Metodología Tradicional. (B) Sandwich Tape. Experimento representativo, n=3.

Adicionalmente, se pueden apreciar protoplastos de menores dimensiones y en menor medida fragmentos de éstos producto de la probable lisis durante el procedimiento de aislamiento.

En marcado contraste, los protoplastos obtenidos por el método «Sandwich Tape» presentan una morfología ovalada en unos casos y en otros de tipo irregular o lisados (Fig. 7B). Por lo anterior, se decidió llevar

a cabo los siguientes experimentos exclusivamente en protoplastos obtenidos por el método tradicional.

5.2 Permeabilización de Protoplastos

La evidencia en la literatura sugiere que la membrana plasmática -pero no mitocondrial- de distintas especies puede ser permeabilizada con concentraciones muy bajas de digitonina (en el rango entre 0.005% y 0.01%) [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2014; Kovács-Bogdán y cols., 2014; Flores-Herrera y cols., 2018]. Con esto en mente, se sometió a los protoplastos de *A. thaliana* aislados por el método tradicional a un procedimiento de permeabilización validado por nuestro grupo para tubos polínicos de *N. tabacum* [Flores-Herrera y cols., 2018]. Se encontró que los protoplastos del grupo control (sin digitonina) sometidos a tinción con Azul de Evans no acumulan este colorante en el citoplasma (Fig. 5). En cambio, al incubar a los protoplastos en presencia de 0.01% de digitonina, el Azul de Evans se acumula en el citoplasma y este es excluido de los cloroplastos.



Figura 9. El azul de evans se acumula en el citoplasma de protoplastos en presencia de digitonina, pero no en su ausencia. Experimento representativo, n=3

Es importante mencionar que el proceso de permeabilización no modificó sustancialmente la morfología de los protoplastos observados bajo el microscopio. Por lo anterior, se decidió llevar a cabo los siguientes experimentos utilizando digitonina al 0.01% como agente permeabilizador.

5.3 Medición del transporte de Ca^{2+} en protoplastos permeabilizados

Al determinar que los protoplastos fueron permeabilizados con digitonina, se realizó un ensayo de transporte de calcio utilizando 1×10^6 protoplastos (Fig. 6).

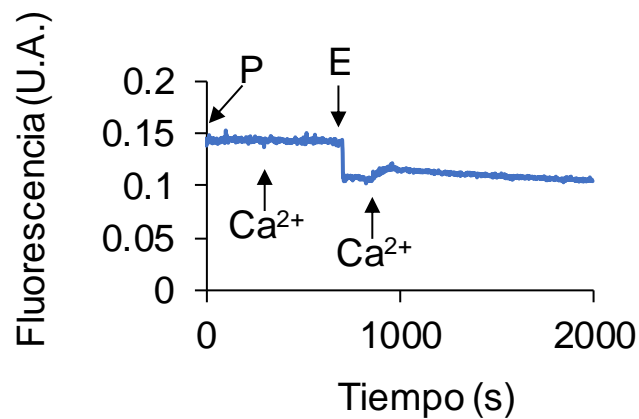


Figura 10. Al utilizar 1×10^6 protoplastos/mL, no se pudo medir transporte de Ca^{2+} . P, protoplastos; Ca^{2+} , Calcio; E, EDTA.

Al adicionar los protoplastos al medio de reacción en amortiguador CRC en presencia del fluoróforo Calcium Green-5N (ver Transporte de calcio intracelular por el método de fluorescencia), se registraron valores estables de fluorescencia inicial. En contra de lo esperado, la adición de

100 μM de CaCl_2 no ocasionó un incremento en la fluorescencia registrada a 530 nm (Fig. 6). Posteriormente, al adicionar 200 μM de EGTA se midió una disminución en la señal asociada a la concentración de calcio (Fig. 6, E). La adición subsecuente de 100 μM de CaCl_2 ocasionó un leve aumento en la señal de fluorescencia la cual fue disminuyendo en forma constante y proporcionalmente al tiempo (Fig. 6). Por lo anterior se decidió repetir el ensayo utilizando una menor cantidad de protoplastos. Experimentalmente se determinó que 2×10^5 protoplastos permiten registrar cambios en la fluorescencia asociados a la adición de Ca^{2+} con mínima interferencia de la concentración de células en el medio por dispersión de luz no específica (Fig. 7).

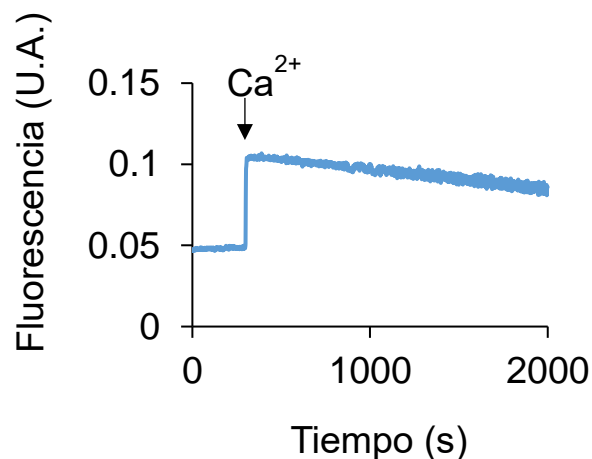


Figura 11. Medición de transporte de Ca^{2+} intracelular utilizando 2×10^5 protoplastos

Una vez determinadas las condiciones para medir el transporte de calcio intracelular en protoplastos aislados de *Arabidopsis thaliana*, se decidió evaluar la sensibilidad del transporte al potente inhibidor del MCU, RuR

[Baughman y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011]. En condiciones control, los protoplastos de *A. thaliana* presentan un aumento en la

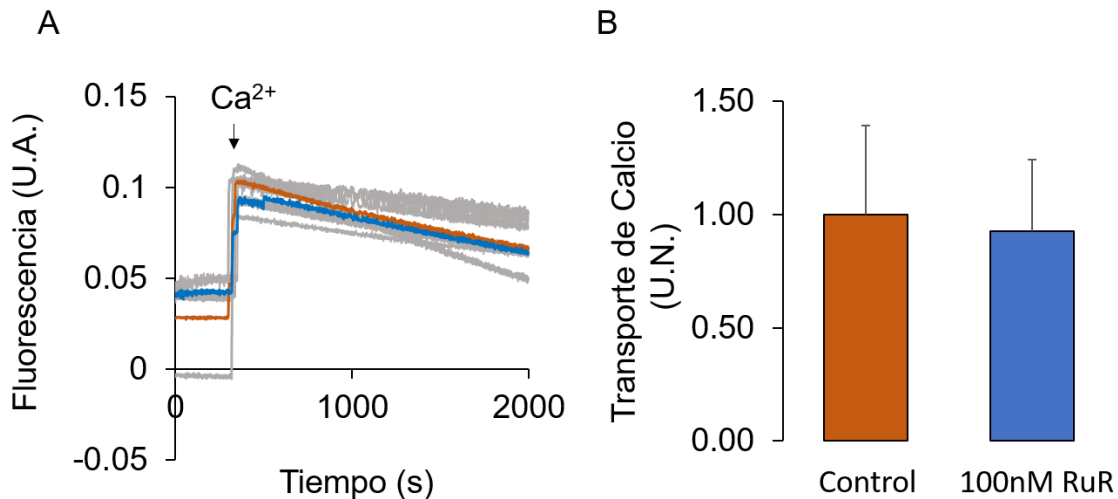


Figura 12. El transporte de calcio intracelular no es sensible al inhibidor RuR. (A) Los ensayos fueron efectuados por triplicado y cuádruplicado para experimentos control y en presencia de 100nM RuR (trazos grises). Los trazos fueron promediados y representados en color marrón (control) y azul (100nM RuR) respectivamente. Las velocidades relativas de transporte fueron promediadas, normalizadas y comparadas utilizando una prueba t. $p=0.864$

fluorescencia del indicador Calcium Green -5N asociada a la adición de calcio (Fig. 8). Posteriormente se registró una disminución constante en la fluorescencia asociada al transporte del catión. En las mismas condiciones, la presencia de 100 nM de RuR no modificó apreciablemente las características del proceso de transporte, lo cual sugiere que éste no es dependiente del uniportador de calcio mitocondrial MCU.

6. Discusión

Aunque hasta ahora se desconocen muchos aspectos sobre el mecanismo de interacción de la digitonina con el colesterol de las membranas celulares [Fan y cols., 2017], existen estudios en membranas biológicas y artificiales que sugieren que los niveles de colesterol están relacionados con la actividad permeabilizadora de la digitonina, y que este efecto es dependiente de las concentraciones de ambas moléculas [Sudji y cols., 2015]. Por lo anterior, a pesar de que las células vegetales poseen niveles relativamente bajos de colesterol en su membrana plasmática, sigue siendo posible inducir la permeabilización con una mayor proporción de digitonina. En estas condiciones se mantiene intacta la estructura y forma de los protoplastos y cloroplastos (Fig. 5). En el ensayo sin digitonina, el colorante queda excluido de las células e incluso se observa como éste forma precipitados en la periferia de los protoplastos. Al garantizar una membrana permeable, podemos asumir la entrada de los pulsos de calcio al citoplasma de la célula y así medir las interacciones de este ion con compartimentos subcelulares.

El transporte de calcio intracelular se ha estudiado desde hace décadas [Carafoli y Lehninger, 1964]. El calcio es necesario para activar la función transcripcional de la célula, pero también tiene funciones metabólicas que se han caracterizado a detalle [Verkhatsky y Toescu, 1998].

En plantas, las células utilizan vías de señalización por calcio en respuesta a factores ambientales tales como la luz roja, hormonas,

gravedad, tacto, estrés por frío y en respuesta a patógenos [Allen y cols., 1995]. Hace más de 50 años fue descrito el papel del calcio en la germinación del polen y el crecimiento de tubos polínicos en distintas especies [Brewbaker y Kwack;1963]. Posteriormente se identificaron algunos canales de membrana plasmática involucrados en el flujo de calcio a tubos polínicos [Hepler y cols., 2012]. En estudios recientes se han caracterizado dos isoformas del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) tanto en raíces como en tubos polínicos de *A. thaliana* [Teardo y cols., 2017; Selles y cols; 2018]. Ambos estudios han concluido mediante el uso de mutantes carentes de isoformas específicas de MCU que el transporte de calcio a la matriz mitocondrial en raíces y tubos polínicos es necesario para el crecimiento de estas estructuras de elongación apical rápida.

En el presente estudio, evaluamos el transporte de calcio en protoplastos permeabilizados. La ventaja de esto es que al realizar los experimentos *in situ*, los resultados obtenidos son muy aproximados al contexto real de la célula, a diferencia de otros en donde se realizan experimentos con organelos aislados o con proteínas reconstituidas.

En los primeros ensayos de medición de transporte de calcio en protoplastos permeabilizados no fue posible obtener una señal asociada a un incremento en la concentración de calcio (Fig. 6). En otras palabras, la adición de pulsos de calcio no ocasionaba incrementos detectables en la fluorescencia. Sin embargo, al adicionar EDTA al medio de reacción,

se observó una disminución en la señal (efecto quelante del EDTA). La adición posterior de calcio ocasionó un aumento paulatino en la señal seguido de una disminución asociada al transporte intraorganelar. Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de EDTA en el medio de reacción altera la cinética de transporte de calcio. En un estudio publicado recientemente por nuestro grupo de investigación, se logró determinar las características del transporte de calcio en mitocondrias de tubos polínicos de *N. tabacum* [Flores-Herrera y cols., 2018, ver anexo]. En este estudio se utilizó un número mucho menor de células (2×10^5). Por esta razón se decidió disminuir la cantidad de protoplastos en los experimentos de transporte en la presente tesis (Fig. 7). En estas condiciones, la señal de fluorescencia basal es relativamente baja y estable durante los primeros 5 minutos del experimento. Este tiempo es en el que se incubaba con digitonina para permeabilizar a las células. Transcurrido ese tiempo se adiciona el calcio, pero esta vez al corregir la cantidad de protoplastos presentes, la señal de fluorescencia aumenta de forma súbita y proporcional a los 100 μM de CaCl_2 adicionados.

La finalidad de la presente tesis fue desarrollar un método fluorométrico *in situ* para medir el flujo de calcio intraorganelar en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* y determinar el papel de la mitocondria en tal proceso. Para tal propósito se llevaron a cabo experimentos de transporte de calcio en presencia de concentraciones mínimas (100nM) del inhibidor de MCU rojo de rutenio. Estas concentraciones han sido utilizadas en

estudios de varios grupos en diversas especies incluyendo nuestros resultados en *N. tabacum*. Si en estas condiciones se logra inhibir la entrada de calcio, es muy probable que la proteína de interés sea MCU [Flores-Herrera y cols., 2018]. Sin embargo, en protoplastos permeabilizados de *A. thaliana* no se observó inhibición mediada por RuR. Es decir, tanto en el grupo control (sin RuR) y el experimento con RuR, el perfil de transporte de calcio es muy similar y no existen diferencias estadísticamente relevantes entre tratamientos (Fig. 8). Esto puede significar que el calcio podría estar siendo canalizado a otros compartimentos subcelulares como el retículo endoplásmico o cloroplastos. En este sentido, existen experimentos recientes que demuestran que los cloroplastos modulan la entrada de calcio intracelular en hojas de *A. thaliana* en forma eficiente [Loro y cols; 2016]. En estos estudios los autores describen un método de medición de transporte de calcio al estroma del cloroplasto usando cepas de *A. thaliana* que expresan sensores específicos de calcio basados en FRET del tipo Amarillo Camaleón (YC). Para medir cambios en la concentración de calcio intracelular y en el estroma, los autores someten a los cloroplastos a un periodo de oscuridad. Pasado cierto tiempo se comienza a detectar un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el estroma de los cloroplastos. Es probable que el sistema de transporte de calcio no sensible a rojo de rutenio descrito en la presente tesis sea el mismo descrito por Loro y colaboradores [2016]. La acumulación de Ca^{2+} en cloroplastos se había

descrito hace más de 70 años [Neish, 1939], pero con el uso de la sonda fluorescente amarillo Camaleón se logran detectar las variaciones del calcio en el citoplasma y estroma de los cloroplastos en función del tiempo [Loro y cols, 2016].

Otra posibilidad sería que existen homólogos de otros canales de entrada de calcio mitocondriales no sensibles a RuR como LETM1 en *A. thaliana* [Manji H y cols; 2012]. Este canal transporta calcio en forma de antiporte con $2H^+$ y bien podría estar activo en nuestras condiciones experimentales. De hecho, existen proteínas homólogas a LETM1 en *A. thaliana* en bases de datos. Además como se muestra en la **Tabla 1** (ver Anexo), la vacuola y el retículo endoplásmico son otros dos reservorios importantes de calcio. En este sentido la vacuola podría ser otro posible lugar de entrada de calcio pues a pesar de no tener la mayor concentración de calcio, esta es de un tamaño superior a la de los otros organelos.

Un análisis sistemático de la presencia del transcrito de MCU en *A. thaliana* revela que el mRNA es detectado predominantemente en polen, flores y raíz, mientras que en hojas -de donde se extraen los protoplastos- su detección es mínima (Fig. 9). Este análisis aunado a

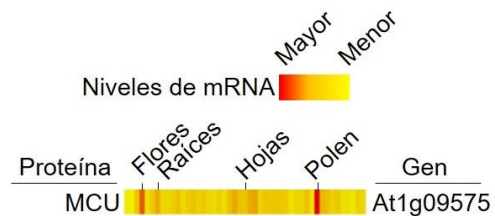


Figura 13. Evaluación de los niveles del RNA del mensajero de MCU en *A. thaliana*. Imagen obtenida de Arabidopsis eFP Browser.

nuestros resultados sugiere que la contribución de MCU en el transporte de calcio en protoplastos es mínima. Esto también deja abierta la posibilidad de estudios a futuro con tubos polínicos o raíces de *A. thaliana* para probar los efectos del rojo de rutenio o derivados como inhibidores de entrada de calcio mitocondrial en diversos tejidos vegetales (Fig. 9).

7. Conclusiones

- Se desarrolló un método para medir el flujo intracelular de calcio en protoplastos por fluorometría.
- El transporte de calcio intracelular no es sensible a bajas concentraciones de RuR.

Bibliografía

- Allen GJ, Muir SR, Sanders D. Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science*. 1995 May 5;268(5211):735-7.
- Ansell, M. P., & Mwaikambo, L. Y. (2009). The structure of cotton and other plant fibres. In *Handbook of textile fibre structure* (pp. 62-94). Woodhead Publishing.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal* (No. 581.1). McGraw-Hill Interamericana
- Baradaran R, Wang C, Siliciano AF, Long SB. Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters. *Nature*. 2018 Jul;559(7715):580-584.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011 Jun 19;476(7360):341-5.
- Bayer, R. G., Stael, S., Rocha, A. G., Mair, A., Vothknecht, U. C., & Teige, M. (2012). Chloroplast-localized protein kinases: a step forward towards a complete inventory. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1713-1723.
- Bick AG, Calvo SE, Mootha VK. Evolutionary diversity of the mitochondrial calcium uniporter. *Science*. 2012 May 18;336(6083):886.

- Brewbaker J.L, Kwack B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 1963; 50: 859-865
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Carafoli E, Lehninger AL. Binding of adenine nucleotides by mitochondria during active uptake of Ca^{2+} . *Biochem Biophys Res Commun.* 1964 May 22;16(1):66-70.
- Cheng, S. H., Willmann, M. R., Chen, H. C., & Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology*, 129(2), 469-485.
- Colombini M. Measurement of VDAC permeability in intact mitochondria and in reconstituted systems. *Methods Cell Biol.* 2007;80:241-60.
- Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. The Yale Journal of Biology and Medicine. 2014;87(4):603-604.
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 2011 Jun 19;476(7360):336-40.
- Deluca, H. F., & Engstrom, G. W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(11), 1744.

- Fan HY, Heerklotz H. Digitonin does not flip across cholesterol-poor membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2017 Oct 15;504:283-293
- Flores-Herrera, C., Preciado-Linares, G., Gonzalez-Vizueth, I., de la Peña, N. C., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2019). In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes. *Protoplasma*, 256(2), 503-509.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jul;25(7):319-24.
- Galva C, Virgin GK, Helms JB, Gatto C. ATP protects against FITC labeling of *Solanum lycopersicon* and *Arabidopsis thaliana* Ca²⁺-ATPase ATP binding domains. *Plant Physiol Biochem.* 2013 Oct;71:261-7.
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG. Molecular aspects of higher plant P-type Ca(2+)-ATPases. *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 1;1465(1-2):52-78.
- Gutiérrez-Aguilar M, Baines CP. Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochem J.* 2013 Sep 15;454(3):371-86.
- Gutiérrez-Aguilar M, Douglas DL, Gibson AK, Domeier TL, Molkentin JD, Baines CP. Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jul;72:316-25.
- Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ. Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 2012 Jan;17(1):32-8.

- Johnson NA, Liu F, Weeks PD, Hentzen AE, Kruse HP, Parker JJ, Laursen M, Nissen P, Costa CJ, Gatto C. A tomato ER-type Ca²⁺-ATPase, LCA1, has a low thapsigargin-sensitivity and can transport manganese. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Jan 15;481(2):157-68.
- Karp G. *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos*. Edición 6^a. Ed. McGraw Hill. 2011.
- Klee, C. B., Newton, D. L., Ni, W. C., & Haiech, J. (1986). Regulation of the calcium signal by calmodulin. In *Calcium and the Cell* (pp. 162-182). John Wiley & Sons Chichester, New York, Brisbane.
- Keinan N, Pahima H, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul;1833(7):1745-54.
- KITANO, U. K. T., SAITO, N., TANIYAMA, A. K. K., TANAKA, C., & NISHIZUKA, Y. (1986). Role of protein kinase C in calcium-mediated signal transduction. *Calcium and the Cell*, 197
- Koncz, C.; Chua, N. H.; Schell, J. ; World Scientific Publishing Co. Pte Ltd. , Singapore , *Methods in Arabidopsis research* , 1992 , 482 pp.
- Kovács-Bogdán E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovanich M, Jambhekar A, Huber RJ, Myre MA, Blower MD, Mootha VK. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 17;111(24):8985-90.

- Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission: regulation and ER connection. *Mol. Cells.* 2014 Feb;37(2):89-94.
- Li H, Lin Y, Heath RM, Zhu MX, Yang Z. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell.* 1999 Sep;11(9):1731-42.
- Logan, D. C., & Knight, M. R. (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants¹. *Plant Physiology*, 133(1), 21-4. Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/218639762?accountid=14598>
- Loro G, Wagner S, Doccula FG, Behera S, Weini S, Kudla J, Schwarzländer M, Costa A, Zottini M. Chloroplast-Specific in Vivo Ca²⁺ Imaging Using Yellow Cameleon Fluorescent Protein Sensors Reveals Organelle-Autonomous Ca²⁺ Signatures in the Stroma. *Plant Physiol.* 2016 Aug;171(4):2317-30.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Apr 18;13(5):293-307
- Manon S, Guérin M. Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochem Mol Biol Int.* 1998 Mar;44(3):565-75.
- McCommis KS, Finck BN. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J.* 2015 Mar 15;466(3):443-54.

- McLaughlin, S. B., & Wimmer, R. (1999). Tansley Review No. 104 Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *The New Phytologist*, 142(3), 373-417
- Means, A. R., VanBerkum, M. F., Bagchi, I., Lu, K. P., & Rasmussen, C. D. (1991). Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacology & therapeutics*, 50(2), 255-270.
- Merchant Azim M., Karolina M. Pajerowska-Mukhtar, Arabidopsis thaliana Dynamic Phenotypic Plasticity in Response to Environmental Conditions, International Journal of Modern Botany, Vol. 5 No. 2, 2015, pp. 23-28.
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3639-44.
- Neish AC Studies on chloroplasts: Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf. *J Biochem* (1939) 33: 300–308

- Nicholls, DG, Ferguson SJ Bioenergetics (Fourth Edition), Academic Press, 2013; 419 pp.
- Nguyen NX, Armache JP, Lee C, Yang Y, Zeng W, Mootha VK, Cheng Y, Bai XC, Jiang Y. Cryo-EM structure of a fungal mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2018 Jul;559(7715):570-574.
- Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, Grabarek Z, Kong L, Liu Z, Ouyang B, Cong Y, Mootha VK, Chou JJ. Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2016 May 12;533(7602):269-73.
- Paillard M, Csordás G, Huang KT, Várnai P, Joseph SK, Hajnóczky G. MICU1 Interacts with the D-Ring of the MCU Pore to Control Its Ca²⁺ Flux and Sensitivity to Ru360. *Mol Cell*. 2018 Nov 15;72(4):778-785.e3.
- Pedroza-García JA, Nájera-Martínez M, de la Paz Sanchez M, Plasencia J. Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Mol Biol*. 2015 Feb;87(3):303-15.
- Rajdev, S., & Reynolds, I. J. (1993). Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca²⁺ concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neuroscience letters*, 162(1-2), 149-152.
- Reiss HD, Herth W. Calcium ionophore A 23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Planta*. 1979 Jan;145(3):225-32.

- Sanders D, Brosnan JM, Muir SR, Allen G, Crofts A, Johannes E. Ion channels and calcium signalling in plants: multiple pathways and cross-talk. *Biochem Soc Symp.* 1994;60:183-97.
- Sang Y, Locy RD, Goertzen LR, Rashotte AM, Si Y, Kang K, Singh NK. Expression, in vivo localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem.* 2011 Jan;49(1):88-95.
- Scott I, Logan DC. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 2008;177(1):90-101.
- Seidel M, Lai FA, Zissimopoulos S. Structural and functional interactions within ryanodine receptor. *Biochem Soc Trans.* 2015 Jun;43(3):377-83.
- Selles B, Michaud C, Xiong TC, Leblanc O, Ingouff M. *Arabidopsis* pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *New Phytol.* 2018 Jul;219(1):58-65.
- Shear CB. 1975. Calcium-related disorders of fruits and vegetables. *HortScience* 10: 361±365.
- Simon, E. W. (1978). The symptoms of calcium deficiency in plants. *New phytologist*, 80(1), 1-15.
- Somlyo AP. Cell physiology: cellular site of calcium regulation. *Nature.* 1984 Jun 7-13;309(5968):516-7.

- Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M. Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot.* 2011;63(4):1525–1542.
- Sudji IR, Subburaj Y, Frenkel N, García-Sáez AJ, Wink M. Membrane Disintegration Caused by the Steroid Saponin Digitonin Is Related to the Presence of Cholesterol. *Molecules.* 2015 Nov 9;20(11):20146-60.
- Teardo E, Carraretto L, Wagner S, Formentin E, Behera S, De Bortoli S, Larosa V, Fuchs P, Lo Schiavo F, Raffaello A, Rizzuto R, Costa A, Schwarzländer M, Szabò I. Physiological Characterization of a Plant Mitochondrial Calcium Uniporter in Vitro and in Vivo. *Plant Physiol.* 2017 Feb;173(2):1355-1370.
- Thompson, L., & Troeh, F. (2002). *Los suelos y su fertilidad.* 4ta. ed. Ed.
- Urbina DC, Silva H, Meisel LA. The Ca²⁺ pump inhibitor, thapsigargin, inhibits root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Res.* 2006;39(2):289-96.
- Verkhatsky A, Toescu EC. *Integrative Aspects of Calcium Signalling.* Springer US. 1998, 1-408p.p.
- Wadleigh CH. Growth of Plants, *Soil.* Yearbook of Agriculture, USDA (1957)
- Wang J, Li Y, Han Z, Zhu Y, Xie Z, Wang J, Liu Y, Li X. Molecular characterization of a ryanodine receptor gene in the rice leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). *PLoS One.* 2012;7(5):e36623.

- Wang Y, Zhu Y, Ling Y, Zhang H, Liu P, Baluska F, Samaj J, Lin J, Wang Q. Disruption of actin filaments induces mitochondrial Ca²⁺ release to the cytoplasm and [Ca²⁺]_c changes in Arabidopsis root hairs. *BMC Plant Biol.* 2010 Mar 24;10:53.
- Weisenseel M.H., Kicherer R.M. (1981) Ionic Currents as Control Mechanism in Cytomorphogenesis. In: Kiermayer O. (eds) Cytomorphogenesis in Plants. Cell Biology Monographs, vol 8. Springer, Vienna
- White PJ. 1998. Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany* 81: 173±183.
- White PJ. 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany* 52: 891±899.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT, Lin CS. Tape-Arabidopsis Sandwich – a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods.* 2009 Nov 24;5:16.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc.* 2007;2(7):1565-72

Anexo:

Tablas 1 y 2

y

Artículo:

In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes.

Especie (órgano)	Contenido de calcio (% en peso seco)
Maíz (hoja madura)	0.7-1.0
Algodón (hoja madura)	0.6-1.5
Tomate (hoja madura)	3.0-4.0
Trigo (parte aérea)	0.4-1.0
Manzano (hoja madura)	1.3-2.2


Tabla 1. Contenido de calcio en porcentaje de peso seco de diferentes plantas [Azcón,2000].

No.	Compartimento Subcelular	Concentración de $[Ca^{2+}]$	Fuente
1	Citoplasma	0.1 μ M-1.0 μ M	[Azcón,2000]
2	Vacuola	80 mM	[Stael, 2011]
3	Cloroplasto	15–25 mM	[Bayer, 2012]
4	Retículo endoplásmico	0.05-0.5 mM	[Stael, 2011]
5	Mitocondria	200 nM	[Logan, 2003]
6	Núcleo	100 nM	[Stael, 2011]

Tabla 2. Concentraciones de calcio en los compartimentos subcelulares.



In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes

Cesar Flores-Herrera¹ · Gisela Preciado-Linares¹ · Israel Gonzalez-Vizueth¹ · Norma Corona de la Peña² · Manuel Gutiérrez-Aguilar¹ 

Received: 29 June 2018 / Accepted: 25 September 2018 / Published online: 4 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

Pollen tubes require functional mitochondria in order to achieve fast and sustained growth. In addition, cell wall expansion requires a calcium gradient in the tube apex formed by a dedicated array of calcium pumps and channels. Most studies have traditionally focused on the molecular aspects of calcium interactions and transport across the pollen tube plasmalemma. However, calcium transients across mitochondrial membranes from pollen tubes are beginning to be studied. Here, we report the presence of a ruthenium red-sensitive mitochondrial calcium uniporter-like activity in tobacco pollen tubes with functional oxidative phosphorylation. The present study provides a framework to measure in situ specifics of mitochondrial transport and respiration in pollen tubes from different plants. The relevance of a mitochondrial calcium uniporter for pollen tube growth is discussed.

Keywords Pollen tubes · Nicotiana · Mitochondrial calcium uniporter · Transport · Digitonin

Abbreviations

MCU	mitochondrial calcium uniporter
AtMCU1	<i>Arabidopsis thaliana</i> mitochondrial calcium uniporter 1
AtMCU2	<i>Arabidopsis thaliana</i> mitochondrial calcium uniporter 2
MICU	EF-hand MCU regulator
MPT	mitochondrial permeability transition
PG	pollen germination
PTA	pollen tube assay

RuR	ruthenium red
ROS	reactive oxygen species

Introduction

Calcium entry into pollen tubes is a physiological process required for cell wall expansion (Hepler et al. 2012). The pollen tube apex is known to concentrate calcium ions through an intricate array of transporters and pumps mediating calcium influx and efflux (Qi et al. 2006; Schiott et al. 2004; Song et al. 2009). Under such conditions, calcium ions can also coordinate with negatively charged pectates to form calcium-pectate aggregates. These newly formed aggregates constitute the basis for cell wall biogenesis during pollen tube expansion (Bosch et al. 2005; Bosch and Hepler 2005; Bosch and Hepler 2006; Braccini and Perez 2001).

Pollen tube organellar calcium transport remains less studied. This could be due to the fact that the cytoplasmic concentration of this cation is several-fold lower, although intraorganellar calcium levels are thought to range from micromolar to millimolar levels (Hepler et al. 2012; Iwano et al. 2009). Oscillating cytoplasmic calcium levels are known to orchestrate metabolic and signaling pathways in several species (Mammucari et al. 2018; Williams et al. 2013). One known

Handling Editor: Peter Nick

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1316-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Manuel Gutiérrez-Aguilar
manu@unam.mx

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México City, Mexico

² Unidad de Investigación en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital Carlos McGregor, México City, Mexico

target for such signaling is located in the mitochondrial network (Collins and Meyer 2010; Perocchi et al. 2010). In line with this, a recent report showed that calcium addition to cucumber roots activates glycolysis and Krebs cycle and activates antioxidant enzymes, while reducing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) emission under hypoxia (He et al. 2015). The mitochondrial calcium uniporter (MCU) complex constitutes the main gateway for intra-mitochondrial calcium accumulation (Baughman et al. 2011; De Stefani et al. 2011). MCU mediates mitochondrial matrix calcium signaling by enhancing ATP production at low calcium levels (Mammucari et al. 2018; Williams et al. 2013). Upon calcium overload however, MCU constitutes an upstream effector responsible for mitochondrial uncoupling due to the opening of the mitochondrial permeability transition (MPT) pore in several species (Uribe-Carvajal et al. 2011).

In *Arabidopsis thaliana*, three MCU isoforms have been discovered (AtMCU1 - AtMCU3), although only AtMCU1 and AtMCU2 have been recently characterized (Selles et al. 2018; Teardo et al. 2017). Plants missing or overexpressing AtMCU1 present shorter roots under restrictive growth conditions alongside deranged mitochondrial ultrastructure (Teardo et al. 2017). Conversely, AtMCU1 and AtMCU2 are both located in vegetative cell mitochondria of pollen grains as well as in pollen tubes. Consequently, absence of AtMCU2 results in decreased pollen grain germination (Selles et al. 2018). These results highlight the importance of regulated mitochondrial calcium transport for growth and reproduction.

Most studies on MCU activity have been traditionally performed in isolated mitochondria (Pan et al. 2013; Sommakia et al. 2017). This can be challenging for pollen tubes, especially if the number of grains obtained per experiment is limited. To bypass such technical difficulties, studies in plants have successfully monitored mitochondrial calcium transport with calcium-sensitive fluorescent proteins such as variants of the genetically encoded cytoplasmic calcium probe Yellow Chameleon YC3.6 (Loro et al. 2012, 2013). This methodology allows to measure dynamics of cytoplasmic or mitochondrial calcium in intact cells subjected to different stimuli in a cell-to-cell basis. However, this methodology does not allow testing sensitivity to MCU inhibitors such as Ruthenium Red (RuR) or Ru-360 and cannot account for the exact contribution of MCU to intracellular calcium relocation. Another method to study intracellular calcium transporters has been applied in *Arabidopsis thaliana* MCU (AtMCU) root hairs (Teardo et al. 2017). This method relies on the overexpression of AtMCU in a cell-free system. AtMCU can then be purified and reconstituted in a planar lipid bilayer setup. This approach allows accurate current measurements in the presence of calcium and

to assess AtMCU sensitivity to RuR. In addition, this method can shed light into which specific residues are responsible for transport or inhibitor binding. One caveat of this technology lies in the fact that potential *in vivo* post-translational modifications, protein-protein interactions, or physiological regulation of the channel under study may be absent in this cell-free system (Teardo et al. 2017). In a similar trend, a recent report has characterized ectopically expressed AtMCU1 and AtMCU2—both highly expressed in pollen grains and tubes—in the MCU-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Selles et al. 2018). This has allowed to monitor calcium transport mediated by both proteins provided a suitable bioluminescent calcium reporter is used. The last methodology for mitochondrial calcium transport relies in the selective permeabilization of cells—but not mitochondria—using low levels of digitonin (Baughman et al. 2011; De Stefani et al. 2011). This method relies on the fact that digitonin is able to form complexes with cholesterol and similar molecules—which are present in the plasmalemma but absent in the mitochondrion—thus allowing rapid cell permeabilization and accurate calcium transient measurements where most interactions between mitochondria and the cytoplasm are preserved. This methodology has been used extensively in mammalian cells as well as in *Dictyostelium discoideum* (Kovacs-Bogdan et al. 2014), but it has never been exploited—to our knowledge—in plants.

Here, we report an *in situ* assessment of a RuR-sensitive, MCU-like activity in permeabilized pollen tubes with oxidative phosphorylation-enabled (coupled) mitochondria from *Nicotiana tabacum*. We discuss the potential relevance of mitochondrial calcium transport for pollen tube growth and energetics.

Materials and methods

Materials

All chemicals were reagent grade. Succinate, mannitol, MES, anhydrous CaCl₂, H₃BO₃, sucrose, KH₂PO₄, RuR, and Evans blue were purchased from Sigma-Aldrich. Calcium Green-5N was purchased from Invitrogen.

Plant materials

Nicotiana tabacum plants were grown in soil under standard greenhouse conditions until flowering. Pollen was collected manually and grown in pollen germination (PG) buffer containing 7% sucrose, 100 μM CaCl₂, 100 μM Ca(NO₃)₂, 1.6 mM H₃BO₃, 15 mM MES pH 5.7 for 2 h at room temperature. Pollen tubes were counted for downstream experiments.

Permeabilization

Pollen tubes were washed twice in pollen tube assay (PTA) buffer containing 330mOsm Mannitol, 1 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 10 mM MES pH 5.7 and resuspended in PTA buffer containing 0.01% digitonin (Kovacs-Bogdan et al. 2014) (Promega) or not (control) and stirred at 60 rpm for 5 min. Plasma membrane permeability was then assessed under the microscope after staining for 5 min with 1% Evans blue followed by extensive washing with PTA buffer.

Calcium transport assessment

Permeabilized pollen tubes were washed and resuspended in PTA buffer supplemented with 10 mM succinate to a concentration of 2×10^5 pollen tubes in a final volume of 1 mL. After incubating the samples for 5 min, 10 μL from a stock solution of 10 mM CaCl_2 were added in order to measure calcium uptake. Extramitochondrial calcium transients were assessed by measuring changes in the fluorescence of 2 μM Calcium Green-5N at $500\text{nm}_{\text{ex}}/530\text{nm}_{\text{em}}$.

Mitochondrial integrity

Permeabilized pollen tubes (1×10^6 cells/mL) were resuspended in PTA buffer supplemented with 10 mM succinate in a water-jacketed chamber at 25 °C. Oxygen consumption was measured polarographically using a Liquid-Phase Hansatech Oxygraph Plus System (Hansatech Instruments). State 3 respiration was induced by adding 200 μM ADP to the reaction mixture. Oligomycin (1 μg) was subsequently added to induce state 4 respiration in order to determine the respiratory control ratio (State 3/State 4 ratio). Rates of oxygen consumption are expressed in $\text{nmol} / (\text{mg} * 10^6 \text{ cells})$. In addition, mitochondrial network morphology was assessed by incubating pollen tubes with 1 μM Mitotracker Green FM for 25 min under mild vacuum. Pollen tubes were then washed twice with PTA buffer and treated with 0.01% digitonin for 5 min. Mitochondrial morphology was assessed at $\times 40$ – 100 magnification using a Nikon Labophot Epifluorescence microscope with a 495nm_{ex} light source coupled to a 520 – 560nm_{em} Nikon EFD-3 bandpass filter.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical evaluation between 2 groups was performed by unpaired *t* tests and a *P* value < 0.05 was considered as criteria of statistical significance.

Results

Prediction of putative MCU proteins in *Nicotiana tabacum*

We sought to determine whether *N. tabacum* harbors an MCU. To do so, we performed a comprehensive search on the Ntab-TN90 NCBI *Nicotiana tabacum* Annotation Release 100 scoring for predicted protein sequences in *N. tabacum* with high similarity to the recently characterized AtMCU1 present in *Arabidopsis thaliana* (Selles et al. 2018; Teardo et al. 2017). We included known MCU orthologs present in *Mus musculus* and *Caenorhabditis elegans* as additional controls (Oxenoid et al. 2016). Our query yielded 11 predicted proteins in *N. tabacum* harboring the ‘SWDVME’ motif present in AtMCU1 (Teardo et al. 2017) (Figs. 1a and S1). Among these sequences, XP016503568.1, XP016449904.1, XP016445882.1 and XP016468560.1 cluster as maximum likelihood orthologs as compared to AtMCU1 (Tamura et al. 2013). However, the last two predicted proteins present Mitoprot *P* values higher than 0.9 suggesting these are likely mitochondrially targeted MCUs (Claros 1995). All predicted proteins present conserved coiled coils as well as the transmembrane domains flanking putative ruthenium red- and calcium-binding residues that have been described for divergent species (Lupas et al. 1991; Oxenoid et al. 2016; Sonhammer et al. 1998) (Fig. 1b).

Digitonin can permeabilize pollen tube plasma membranes, while mitochondrial respiration and morphology are preserved

In order to assess potential MCU activity in tobacco pollen tubes, we first sought to assess whether low concentrations of digitonin could effectively permeabilize plasma—but not mitochondrial—membranes. We incubated *N. tabacum* pollen tubes in the absence (control) or presence of 0.01% digitonin for 5 min and assessed plasmalemmal permeability with Evans Blue staining under the microscope (Fig. 2a, b). Control-treated cells were mostly impermeable to Evans Blue, whereas digitonin-treated pollen tubes were largely stained with this dye, suggesting plasmalemmal permeability can be induced with digitonin in pollen tubes irrespective of whether pollen tubes were allowed to grow for 1.5, 2 or 4 h (Fig. 2a, b).

We next assessed whether mitochondrial respiratory chain functionality was affected after treatment with digitonin by monitoring pollen tube mitochondrial oxygen consumption in the presence of digitonin (Fig. 3a). To achieve so, the rates of oxygen consumption were sequentially measured in the presence of ADP (state 3 respiration) and following oligomycin addition (state 4 respiration). Our results show a respiratory control ratio (state 3/state 4) higher than 2, which is similar to values reported for other species (Perez-Vazquez et al. 2003) and indicates pollen tube mitochondrial coupling in the presence of digitonin.

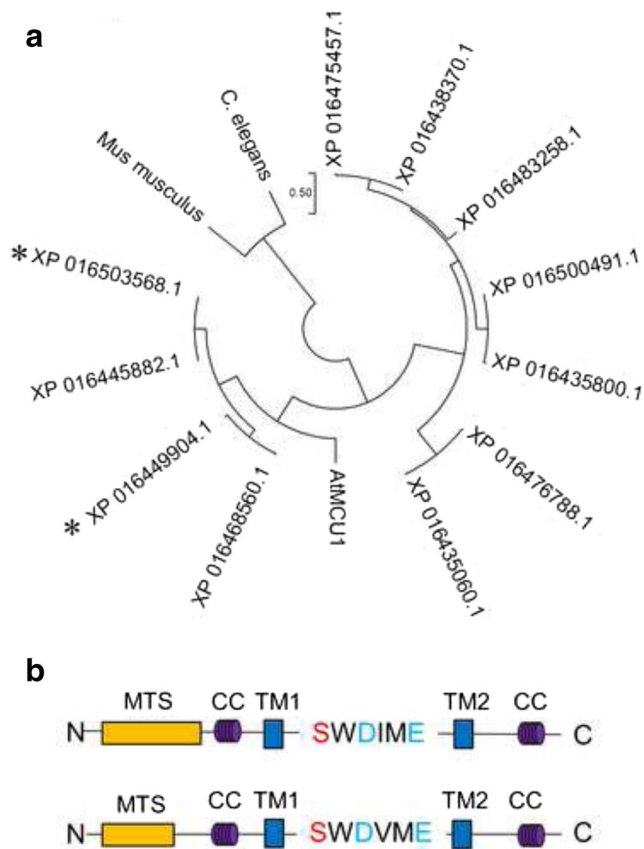


Fig. 1 Molecular phylogenetic analysis of MCU homologs by the maximum likelihood method. **(a)** The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the JTT matrix-based model. The tree with the highest log likelihood (-4231.80) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 14 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 241 positions in the final dataset. **(b)** MCU domain map from *Mus musculus* (upper cartoon) versus *N. tabacum* (lower cartoon) as predicted using Mitoprot, COILS and TMHMM respectively

Importantly, mitochondrial network morphology was retained under these conditions (Fig. 3b). Taken together, these results show that digitonin-mediated plasmalemma permeabilization does not affect pollen tube mitochondrial function.

Permeabilized pollen tubes present a RuR-sensitive calcium transport activity

In order to assess the potential participation of an MCU in the regulation of intracellular calcium transients in pollen tubes, we challenged digitonin-treated pollen tubes with a $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 bolus in the presence of Calcium Green-5N at increasing cellular densities (Fig. 4a). Our results show that 2×10^5 pollen tubes per mL present a slow but steady intracellular calcium intake. We considered these conditions as optimal for further experiments,

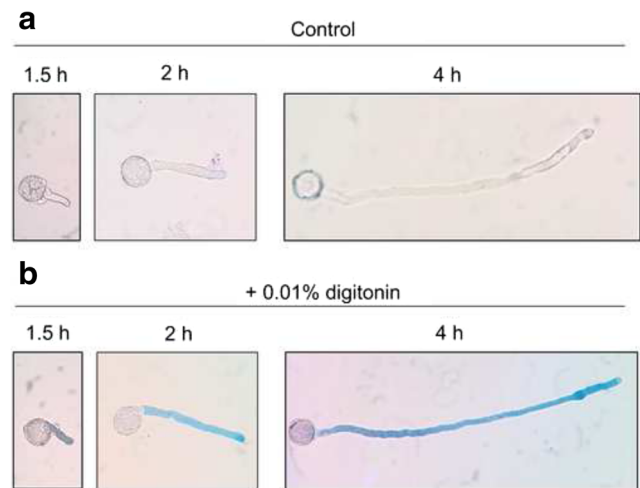


Fig. 2 Digitonin-mediated permeabilization of pollen tubes. Pollen grains were allowed to grow in PG buffer for 1.5, 2, and 4 h, washed twice in PTA buffer and incubated with 1% Evans Blue under control conditions **(a)** or in the presence of 0.01% digitonin for 5 min **(b)**. Pollen tube staining was then assessed under the microscope

since higher cellular densities interfered with fluorescence measurements even at the baseline (Fig. 4a). We next measured calcium transport activity in the absence (control) or presence of 100 nM RuR, which efficiently blocks MCU-dependent calcium transport in several models (De Stefani et al. 2011; Kovacs-Bogdan et al. 2014; Oxenoid et al. 2016; Pan et al. 2013). Under control conditions, fluorescence spiked after calcium additions and steadily decreased indicating intraorganellar calcium deposition (Fig. 4b). In the presence of RuR, however, calcium accumulation was significantly decreased as assessed by the rate of fluorescence changes associated with calcium transport (Fig. 4b, c).

Discussion

Successful assessment of mitochondrial function and calcium transport has been reported in permeabilized mammalian, nematode, insect, amoebae and yeast cells (Kovacs-Bogdan et al. 2014; Oxenoid et al. 2016; Pan et al. 2013; Uribe et al. 1992; von Stockum et al. 2011). However, the properties of mitochondrial calcium transport have only been systematically assessed in mammalian cells (Mammucari et al. 2018). This could be due to the fact that MCU was first discovered in cells from this clade (DeLuca and Engstrom 1961). Nevertheless, studies from two groups have recently shown that *Arabidopsis thaliana* harbors a canonical MCU in roots and pollen grains (Selles et al. 2018; Teardo et al. 2017). These studies well match high throughput screens showing MCU mRNA enrichment in cells from such sources (Waese et al. 2017). We therefore sought to assess whether it was possible to monitor mitochondrial calcium transport in permeabilized pollen tubes and if under such conditions we could also assess mitochondrial respiratory chain activity. We found a

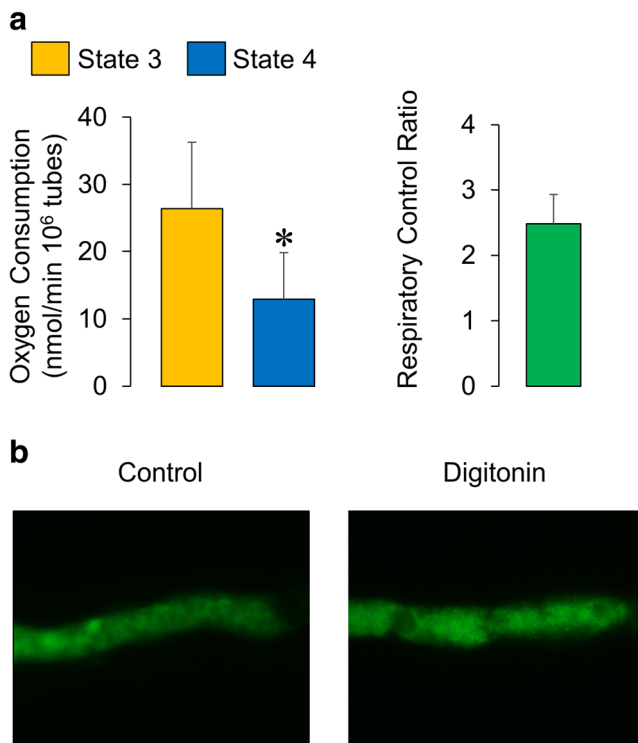


Fig. 3 Mitochondrial function and morphology in permeabilized pollen tubes. Permeabilized pollen tubes were grown for 2 h and resuspended at 1×10^6 pollen tubes/mL in PTA buffer in a water-jacketed oxygen consumption chamber in the presence of 10 mM succinate plus 0.01% digitonin. **(a)** State 3 and 4 respiration as well as the respiratory control ratio were measured as detailed in the ‘Materials and methods’ section. **(b)** Pollen tubes were grown for 2 h and stained with 1 μ M Mitotracker Green FM in the absence (control) or presence of 0.01% digitonin as detailed in the ‘Materials and methods’ section and mitochondrial network morphology was assessed by fluorescence microscopy

pollen tube density-dependent increase in calcium mobilization and further determined that our method allows to monitor calcium transients with as little as 2×10^5 pollen tubes per experiment (standard conditions). In addition, we found that at higher cell densities, our method presents fluorescence interference at the baseline, which may constitute a source of error in calcium transport rate quantifications. Under the standard conditions described herein, calcium transport is rather slow when compared with MCU-dependent transport in mammalian mitochondria (Baughman et al. 2011). This could be due to the low amounts of mitochondria used for our experiments versus isolated mitochondria or permeabilized mammalian cells (De Stefani et al. 2011). This also implies that *N. tabacum* pollen tube mitochondria display an elevated calcium buffering capacity. That being said, we have also found a distant MCU accessory subunit homolog to MICU1 (Fig. S1) but not the MCU accessory subunits MICU2 or EMRE (Penna et al. 2018) in the *N. tabacum* genome (not shown). This could potentially result in divergent calcium transport kinetics and further suggest that mitochondrial calcium in *N. tabacum* pollen tubes is a less regulated process when compared with MCU-dependent calcium transport in mitochondria from organisms of different clades.

In mammalian mitochondria, low-matrix calcium levels activate Krebs cycle enzymes and ATP generation (Mammucari et al. 2018). Upon calcium overload however, mitochondrial calcium activates permeability transition and cell death (Baines and Gutierrez-Aguilar 2018). These reasons highlight the importance of a regulated calcium cycle, which finely tunes metabolism and growth while avoiding mitochondrial dysfunction due to calcium overload (Denton and McCormack 1980).

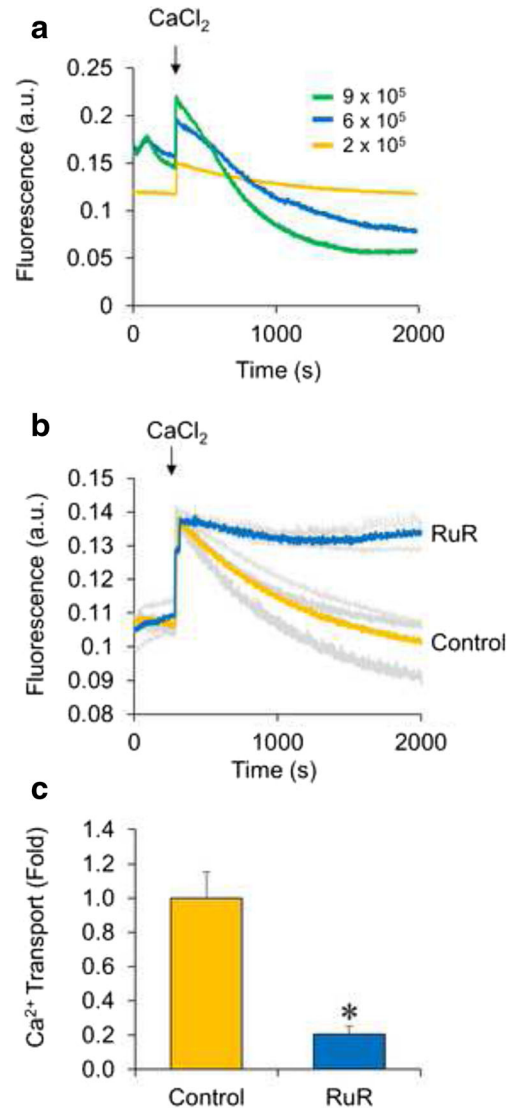


Fig. 4 Assessment of calcium transport activity in permeabilized pollen tubes. **(a)** Permeabilized pollen tubes were treated as in Fig. 3 and incubated in PTA buffer containing 10 mM succinate and 2 μ M Calcium Green-5N for 5 min following a single 100 μ M calcium pulse at the indicated cell densities. **(b)** Fluorescence changes were monitored in the absence (control) or presence of 100 nM RuR after calcium additions. Biological triplicates for each condition are denoted as gray traces and fluorescence values were averaged and plotted for each control (yellow trace) and RuR (blue trace) conditions. **(c)** Calcium transport rates in pollen tubes were quantified under control conditions and compared to calcium transport in the presence of RuR. Error bars indicate s.e.m. * $P < 0.05$ versus control conditions

In this study, we also assessed in situ mitochondrial respiration upon plasmalemma permeabilization. This was achieved in the presence of mitochondrial respiratory substrates such as succinate. Under these conditions, coupled mitochondria are capable of phosphorylating exogenously added ADP and when challenged with oligomycin, phosphorylation stops, a transient respiration baseline is obtained, and a respiratory control ratio can be calculated. Previous studies suggest metabolism may be reestablished under the latter conditions through fermentation (Rounds et al. 2010, 2011). On a different token, digitonin treatment lacked any noticeable effects on the mitochondrial morphology in our pollen tube preparations, which is in agreement with studies in mammalian cells (Fiskum 1985) and indicates that the permeabilizing effects of this non-ionic detergent are absent in mitochondrial membranes. Previous reports indicate that pollen tubes from *Helleborus foetidus* and *Galanthus nivalis* are largely impermeable to Evans blue unless pollen grain permeability was compromised (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1988). Upon loss of such permeability, pollen grains are unable to germinate. When permeabilized with digitonin, our pollen tube preparations also stopped growing possibly due to the collapse in cytoplasmic calcium gradients derived from digitonin-mediated permeabilization (not shown). This is perhaps one caveat of the permeabilization approach we implemented in the present study. However, it is tempting to speculate whether subsequent cholesterol addition reseals membranes and resumes pollen tube growth.

Taken together, our results provide a simple, fast, and reproducible technical approach to measure mitochondrial calcium transport alongside respiratory chain activity in tobacco pollen tubes. This may allow to further characterize mitochondrial processes in pollen tubes from other plants without the need of isolating and purifying such organelles.

Acknowledgements This work was supported by grant UNAM-FQ-PAIP 5000-9171 (to M.G.-A.). We would like to thank Dr. Sobeida Sánchez-Nieto and Dr. Felipe Cruz-García for providing valuable material resources and advice for the completion of this study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Baines CP, Gutierrez-Aguilar M (2018) The still uncertain identity of the channel-forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium* 73:121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.05.003>
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Bosch M, Cheung AY, Hepler PK (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* 138:1334–1346. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059865>
- Bosch M, Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17:3219–3226. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037473>
- Bosch M, Hepler PK (2006) Silencing of the tobacco pollen pectin methylesterase NtPPME1 results in retarded in vivo pollen tube growth. *Planta* 223:736–745. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0131-x>
- Braccini I, Perez S (2001) Molecular basis of C(2+)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2:1089–1096
- Claros MG (1995) MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci* 11:441–447
- Collins S, Meyer T (2010) Cell biology: a sensor for calcium uptake. *Nature* 467:283. <https://doi.org/10.1038/467283a>
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>
- Deluca HF, Engstrom GW (1961) Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47:1744–1750
- Denton RM, McCormack JG (1980) On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 119:1–8
- Fiskum G (1985) Intracellular levels and distribution of Ca²⁺ in digitonin-permeabilized cells. *Cell Calcium* 6:25–37
- He L, Li B, Lu X, Yuan L, Yang Y, Yuan Y, du J, Guo S (2015) The effect of exogenous calcium on mitochondria, respiratory metabolism enzymes and ion transport in cucumber roots under hypoxia. *Sci Rep* 5:11391. <https://doi.org/10.1038/srep11391>
- Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ (2012) Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci* 17:32–38. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.007>
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1988) Some permeability properties of angiosperm pollen grains, pollen tubes and generative cells. *Sex Plant Reprod* 1:65–73. <https://doi.org/10.1007/bf00189264>
- Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita M, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama S (2009) Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol* 150:1322–1334. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139329>
- Kovacs-Bogdan E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovanich M, Jambhekar A, Huber RJ, Myre MA, Blower MD, Mootha VK (2014) Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8985–8990. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400514111>
- Loro G, Drago I, Pozzan T, Schiavo FL, Zottini M, Costa A (2012) Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial Ca²⁺(+) handling relationship in plant cells. *Plant J* 71:1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04968.x>
- Loro G, Ruberti C, Zottini M, Costa A (2013) The D3cpv Cameleon reports Ca²⁺(+) dynamics in plant mitochondria with similar kinetics of the YC3.6 Cameleon, but with a lower sensitivity. *J Microsc* 249:8–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03683.x>
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252:1162–1164. <https://doi.org/10.1126/science.252.5009.1162>
- Mammucari C, Raffaello A, Vecellio Reane D, Gherardi G, De Mario A, Rizzuto R (2018) Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models *Pflugers Arch* <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2123-2>

- Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, Grabarek Z, Kong L, Liu Z, Ouyang B, Cong Y, Mootha VK, Chou JJ (2016) Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 533: 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature17656>
- Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* 15:1464–1472. <https://doi.org/10.1038/ncb2868>
- Penna E, Espino J, De Stefani D, Rizzuto R (2018) The MCU complex in cell death. *Cell Calcium* 69:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.008>
- Perez-Vazquez V, Saavedra-Molina A, Uribe S (2003) In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J Bioenerg Biomembr* 35:231–241
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature* 467:291–296. <https://doi.org/10.1038/nature09358>
- Qi Z, Stephens NR, Spalding EP (2006) Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol* 142:963–971. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088989>
- Rounds CM, Hepler PK, Fuller SJ, Winship LJ (2010) Oscillatory growth in lily pollen tubes does not require aerobic energy metabolism. *Plant Physiol* 152:736–746. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150896>
- Rounds CM, Winship LJ, Hepler PK (2011) Pollen tube energetics: respiration, fermentation and the race to the ovule. *AoB Plants* 2011: plr019. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr019>
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004) A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9502–9507. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401542101>
- Selles B, Michaud C, Xiong TC, Leblanc O, Ingouff M (2018) *Arabidopsis* pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *New Phytol* 219:58–65. <https://doi.org/10.1111/nph.15189>
- Sommakia S, Houlihan PR, Deane SS, Simcox JA, Torres NS, Jeong MY, Winge DR, Villanueva CJ, Chaudhuri D (2017) Mitochondrial cardiomyopathies feature increased uptake and diminished efflux of mitochondrial calcium. *J Mol Cell Cardiol* 113:22–32. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.09.009>
- Song LF, Zou JJ, Zhang WZ, Wu WH, Wang Y (2009) Ion transporters involved in pollen germination and pollen tube tip-growth. *Plant Signal Behav* 4:1193–1195
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6:175–182
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Teardo E, Carraretto L, Wagner S, Formentin E, Behera S, de Bortoli S, Larosa V, Fuchs P, Lo Schiavo F, Raffaello A, Rizzuto R, Costa A, Schwarzländer M, Szabò I (2017) Physiological characterization of a plant mitochondrial calcium uniporter in vitro and in vivo. *Plant Physiol* 173:1355–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01359>
- Uribe S, Rangel P, Pardo JP (1992) Interactions of calcium with yeast mitochondria. *Cell Calcium* 13:211–217
- Uribe-Carvajal S, Luevano-Martinez LA, Guerrero-Castillo S, Cabrera-Orefice A, Corona-de-la-Pena NA, Gutierrez-Aguilar M (2011) Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* 11:382–390. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.004>
- von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Sabatelli P, Forte MA, Bernardi P (2011) Properties of Ca(2+) transport in mitochondria of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 286:41163–41170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.268375>
- Waese J, Fan J, Pasha A, Yu H, Fucile G, Shi R, Cumming M, Kelley LA, Sternberg MJ, Krishnakumar V, Ferlanti E, Miller J, Town C, Stuerzlinger W, Provart NJ (2017) ePlant: visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell* 29:1806–1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>
- Williams GS, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ (2013) Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10479–10486. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300410110>